

Microvesículas endoteliales

Marcadores de daño endotelial y estrés oxidativo en la enfermedad renal crónica

Estefanya Lisset García Menéndez

Tesis Doctoral - UAM / 2021

Directores: José María Portolés Pérez / María de San Miguel Marques Vidas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Don José María Portolés Pérez, Profesor Asociado de Ciencias de la Salud de
Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid y Jefe del Servicio de
Nefrología del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda y

Doña María de San Miguel Marques Vidas, Profesora Asociada de Ciencias de la Salud de
Departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid

CERTIFICAN

Que Doña Estefanya Lisset García Menéndez, licenciada en Medicina por la Universidad
de Guayaquil (Ecuador), ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado “*Microvesículas
endoteliales como marcadores de daño endotelial y estrés oxidativo en la enfermedad
renal crónica*”, que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firman la presente en Madrid.

José María Portolés Pérez

María de San Miguel Marques Vidas

La presente Tesis Doctoral se engloba dentro de las líneas de investigación de la red pública de investigación renal REDInREN RD12 / 0021 / 0019 y RD16 / 009 / 009 y ha sido cofinanciada por los proyectos competitivos FIS Instituto de Salud Carlos III; Expedientes: PI14 / 00806 (2015 - 2018) y FIS PI19 / 00240 (2020 - 2022).



Resumen

Introducción: la enfermedad renal crónica (ERC) constituye un grave problema de salud por su prevalencia, morbilidad, impacto personal y sociosanitario. Tiene una prevalencia creciente, en parte debido a un tradicional infradiagnóstico y al aumento de factores que promueven su progresión como la diabetes mellitus (DM), la obesidad o la hipertensión arterial (HTA) entre otros. La ERC esta llamada a ser la segunda causa de muerte en un futuro próximo en nuestro país. Por todo ello, nuestro sistema de salud tiene como prioridad el prevenir, detectar y frenar la progresión de la ERC, para evitar sus estadios más avanzados que comprometen los objetivos en salud y la propia sostenibilidad del sistema. La ERC y la enfermedad cardiovascular comparten múltiples factores de riesgos clásicos como la diabetes, el tabaquismo, la hipertensión, la hipercolesterolemia y la edad. Pero esto, por sí solo, no explica la elevada tasa de mortalidad de origen cardiovascular que asocia la ERC.

Asimismo, existen otros factores de riesgo cardiovascular considerados no tradicionales como son la propia uremia, las alteraciones del metabolismo fósforo-calcio, el aumento del estrés oxidativo, la malnutrición, la hiperhomocisteinemia y la disfunción endotelial e inflamación crónica que podrían explicar esta elevada morbi-mortalidad. El estrés oxidativo, presente en múltiples patologías, es el estado de desequilibrio entre sustancias pro y antioxidantes. Sin embargo, la relación casual entre el estrés oxidativo y la enfermedad cardiovascular en la ERC aún no se ha perfilado en todos sus detalles.

En los últimos años, se han propuesto nuevos biomarcadores para estudiar el funcionamiento del endotelio. Todas las células eucariotas pueden liberar microvesículas (MV) que albergan un subconjunto de lípidos de membrana celular y proteínas derivadas de sus células parenterales. Las microvesículas derivadas del endotelio (MVEs) se han descrito como un marcador precoz de disfunción endotelial.

Hipótesis: la ERC asocia una elevada morbilidad de origen cardiovascular, que es consecuencia tanto de factores de riesgo convencionales como del estado proinflamatorio propio de la uremia, que generaría una cascada de eventos desembocando en este estado de fragilidad. En los últimos años, ha aumentado el interés en la búsqueda de nuevos biomarcadores que nos puedan ayudar a caracterizar de manera precoz a los pacientes con mayor riesgo. La MVEs se han identificado como un importante biomarcador en patología cardiovascular, por lo que es de interés saber cuales son sus mecanismos de formación y su función a nivel celular, así como conocer su integración con otros marcadores de disfunción endotelial. En la ERC, las MVEs

pueden ser simultáneamente un marcador precoz de daño y un agente modulador al funcionar dentro de una red de comunicación intercelular, expresando y transportando diferentes tipos de proteínas y material genético, que puedan activar otros biomarcadores. Por tanto, es importante investigar cual es su comportamiento en los diferentes estadios de ERC, incluyendo el estadio 5D, una vez que hemos resuelto el estado de uremia máximo.

Objetivo: describir la presencia de MVEs en diferentes estadios de ERC y analizar su asociación con otros biomarcadores de disfunción endotelial, como los productos de proteína de oxidación avanzada (AOPP) y el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), así como con parámetros analíticos habituales en el seguimiento de los pacientes con ERC. Analizar el efecto sobre las MVEs en la corrección de la uremia con diálisis y de los fármacos habitualmente empleados en ERC. Para finalizar, estudiar en detalle estos mecanismos evaluando el efecto de las MV del paciente con Nefropatía diabética sobre cultivos celulares endoteliales.

Material y métodos: se trata de un estudio piloto observacional y transversal realizado tanto *in vitro* como *in vivo*. Para el estudio *in vivo* se recogieron muestras sanguíneas de 41 pacientes de la consulta de enfermedad renal crónica y 30 pacientes en programa de hemodiálisis crónica (HD), excluyendo a los pacientes con procesos inflamatorios agudos.

Para el estudio *in vitro* utilizamos tres pools de plasma de pacientes con ERC no dependiente de diálisis, con hemodiálisis (Pre / Post) y con diálisis peritoneal. El estudio se engloba dentro de las líneas de investigación de la red pública de investigación renal REDInREN RD12 / 0021 / 0019 y RD16 / 009 / 009 cofinanciada por los proyectos competitivos FIS Instituto de Salud Carlos III; Expedientes: PI14 / 00806 (2015 - 2018) y FIS PI19 / 00240 (2020 - 2022).

Resultados: hemos detectado un aumento en los niveles de MVEs circulantes en los pacientes con ERC, en comparación con el grupo control (171 MVEs/ μ l [119,5 - 241] vs 68,5 MVEs/ μ l [55 - 115], $p < 0,001$). No hemos objetivado una relación lineal con la pérdida del filtrado glomerular en los diferentes estadios de ERC. Asimismo, no encontramos ninguna asociación con la etiología de la ERC ni con la comorbilidad cardiovascular asociada (cardiopatía isquémica, artropatía periférica e HTA). Otros factores de riesgo cardiovascular convencionales como el tabaco y el alcohol no condicionan diferencias en los niveles de MVEs. Sin embargo, si hemos constatado que los pacientes diabéticos presentan niveles más bajos de MVEs circulantes que los no

diabéticos, 228 MVEs/ μ l [159 - 257] vs 127 MVEs/ μ l [92,5 – 163,5] $p < 0,05$. Existe una correlación negativa entre la edad y los niveles de MVEs (test de Spearman $p < 0,05$). El grupo del 2º tercil > 50 años y 3º tercil > 70 años presentan menores niveles de MVE $p < 0,001$ (grupo 1 vs 3 $p < 0,002$ / grupo 2 vs 3 $p < 0,001$). Finalmente, las MVEs mantienen una relación lineal con los valores séricos de colesterol total $p < 0,02$. Por otro lado, observamos una tendencia hacia niveles elevados de AOPP en la ERC, pero sin mostrar correlación con las MVEs circulantes. Tampoco existe una correlación lineal entre MVE y VEGF.

El tratamiento crónico con hemodiálisis no restaura los valores de las MVEs a la normalidad. Así, los niveles de MVEs en los pacientes en diálisis se mantienen elevados aun más que en los estadios previos de ERC sin diálisis: HD 470 MVEs/ μ l [60 – 1800] vs ERC 171 MVEs/ μ l [119,5 - 241], diferencias no significativas. El análisis de los valores MVEs, a lo largo de una sesión de HD, demuestra que este método de corrección de la uremia analizado de forma aislada, tampoco consigue restaurar los niveles de MVEs (Niveles PreHD 375 MVEs/ μ l [50 - 1500] y niveles PostHD 155 MVEs/ μ l [40 - 230], test de Friedman $p < 0,3$).

Hemos analizado el efecto de los fármacos habituales en la práctica clínica en la población con ERC no diálisis y encontramos que la asociación de estatinas y antiagregantes plaquetarios disminuye significativamente la cantidad de MVEs. Así, los niveles circulantes de MVEs en cada grupo terapéutico se reducen significativamente, frente a la referencia de los no tratados. Aquellos que reciben estatinas tienen 169,5 MVEs/ μ l [132 – 239,5], antiagregantes plaquetarios 138 MVEs/ μ l [118 – 161,5] y ambos fármacos 93 MVEs/ μ l [71 - 120] frente a 230 MVEs/ μ l [201 - 255] los no tratados, $p < 0,001$ según test Kruskal-Wallis. El efecto de ambos grupos terapéuticos sobre la reducción de los niveles de MVEs parece ser independiente de la reducción de colesterol total sérico ($\beta = - 97,81$ IC - 181,8711 a - 13.75).

En el estudio *in vitro*, objetivamos que el plasma de los pacientes con ERC en cualquier estadio inducía un aumento en la expresión de ICAM y VCAM en los cultivos de células HUVEC ($p < 0.006$) respecto al plasma del grupo control. Las microvesículas no parecen tener efecto sobre VCAM, pero si sobre ICAM en los cultivos celulares, disminuyendo su presencia en todos los grupos. El plasma de los pacientes con ERC en cualquier estadio indujo una menor proliferación celular en los cultivos celulares HUVEC y la presencia de microvesículas acentuaba estos resultados. El plasma de pacientes con ERC indujo un aumento de la tasa de apoptosis en todos los grupos ($p < 0,05$). El plasma de HD tanto Pre como Post fueron los que más tasa de apoptosis indujeron respecto a ERC y diálisis

peritoneal ($p < 0,05$). La presencia de microvesículas aumentó esta tasa de apoptosis en todos los grupos salvo en el de DP ($p < 0,05$).

Conclusiones: nuestro trabajo describe, por primera vez que los pacientes con ERC presentan niveles elevados de MVEs circulantes, de forma similar a lo descrito en cardiopatas, sin tener una asociación lineal con la activación de VEGF y AOPPs. Dado el elevado riesgo cardiovascular en los pacientes con ERC, resulta de vital importancia la búsqueda de biomarcadores precoces y posibles dianas terapéuticas como las MVEs. En nuestro estudio piloto, vemos como los pacientes con ERC expresan niveles circulantes elevados de MVEs y AOPP como reflejo de una afectación endotelial, sin mantener una relación lineal entre ambos. Tenemos razones para pensar, que esta elevación de MVEs, es un mecanismo compensador que intenta mantener las homeostasis del organismo, a través de una red de comunicación intercelular que activa todos los posibles mediadores implicados en la reparación endotelial. La población diabética ha presentado menor cantidad de MVEs, hallazgos que no concuerda con estudios previos, probablemente debido a fármacos utilizados habitualmente en esta población para reducir el riesgo cardiovascular.

Las estatinas y los antiagregantes plaquetarios utilizados en ERC asocian una reducción de los valores de las MVEs circulantes, casi hasta los valores de la población sana. La edad también parece ser un determinante en el número de MVEs. No existe relación de las de MVEs con el VEGF, con los AOPP, ni con otros marcadores de reactante de fase aguda. Este hallazgo sugiere, una vez más, ese papel precoz de estos marcadores, que tal vez interactúan como un equipo de atención de primera llamada a nivel del endotelio.

La corrección del estado de uremia con la diálisis, no modifica los niveles de MVEs, incluso los eleva aún más. Esto podría depender de una función renal aún más reducida y de otros múltiples factores como la técnica dialítica, las membranas utilizadas en el filtro o el acceso vascular entre otros. Dada esta enorme variabilidad, no hemos podido encontrar una relación lineal con ninguno de estos factores. Las estatinas y antiagregantes plaquetarios no mantienen su efecto a nivel de las MVEs en los pacientes en HD.

Por último, el plasma de los pacientes con enfermedad renal asociada a diabetes induce la proliferación y apoptosis del endotelio activando las moléculas de adhesión, además viéndose influenciados estos mecanismos por la presencia o no de las microvesículas. Son necesarios más estudios que permitan distinguir si las MVEs son propiamente efectores de daño endotelial o simplemente biomarcadores subrogados.

Abstract

Introduction: chronic kidney disease (CKD) constitutes a serious health problem due to its prevalence, morbidity and mortality, personal and social health impact. It has an increasing prevalence due to a traditional underdiagnosis and the increase in factors that promote its progression such as diabetes mellitus (DM), obesity or arterial hypertension (HTA) among others. CKD is called to be the second cause of death in the near future in our country. For all these reasons, our health system has as a priority to prevent, detect and slow down the progression of CKD to avoid its most advanced stages that compromise the health goals and the sustainability of the system itself. CKD and cardiovascular disease share multiple classic risk factors such as diabetes, smoking, hypertension, hypercholesterolemia, and age. But this alone does not explain the high cardiovascular mortality rate associated with CKD.

Likewise, there are other non-traditional cardiovascular risk factors treated such as uremia, alterations in phosphorus-calcium metabolism, increased oxidative stress, malnutrition, hyperhomocysteinemia, endothelial dysfunction and chronic inflammation that could explain this high morbidity and mortality. Oxidative stress, present in multiple pathologies, is the state of disbalance between pro and antioxidant substances. However, the casual relationship between oxidative stress and cardiovascular disease in CKD has not yet been outlined.

In recent years, new biomarkers have been proposed to study the functioning of the endothelium. All eukaryotic cells can release microvesicles that harbor a subset of cell membrane lipids and proteins derived from their parenteral cells. Endothelial-derived microvesicles (MVEs) have been described as an early marker of endothelial dysfunction.

Hypothesis: CKD is associated with high cardiovascular morbidity, which is a consequence of the conventional risk factors and the pro-inflammatory state of uremia. This situation would generate a cascade of events leading to this state of fragility. In recent years, has increased the interest in the search for new biomarkers that can help us early to characterize patients with higher risk. MVEs have been identified as an important biomarker in cardiovascular disease, so it is of interest to know what their formation mechanisms and function are at the cellular level. As well as knowing its integration with other endothelial dysfunction markers. In CKD, MVEs can simultaneously be an early damage marker and a modulating agent by functioning within an intercellular communication network, expressing and transporting different types of proteins and genetic material, which can activate other biomarkers. Therefore, it is

important to investigate its behavior in the different stages of chronic kidney disease, including stage 5D, once we have resolved the maximum uremia state.

Objectives: describe the presence of MVEs in different stages of CKD and analyze their association with other biomarkers of endothelial dysfunction, such as advanced oxidation protein products (AOPP) and vascular endothelial growth factor (VEGF), as well as with common analytical parameters in the follow-up of patients with CKD. We also want to analyze the effect on MVEs in the correction of uremia with dialysis and the drugs commonly used in CKD. Finally, we would like to study these mechanisms in detail by evaluating the effect of the MVs of patients with diabetic nephropathy on endothelial cell cultures.

Material and methods: it is an observational and cross-sectional pilot study carried out both *in vitro* and *in vivo*. For the *in vivo* study, blood samples were collected from 41 patients from the chronic kidney disease clinic and 30 patients on a chronic hemodialysis (HD) program, excluding patients with acute inflammatory processes. For the *in vitro* study, we used three plasma pools from patients with CKD not dependent on dialysis, with hemodialysis (Pre / Post) and with peritoneal dialysis. The study is included within the research lines of the public kidney research network REDInREN RD12 / 0021/0019 and RD16 / 009/009 co-financed by the competitive projects FIS Instituto de Salud Carlos III 201; Files: PI14 / 00806 (2015 - 2018) and FIS PI19 / 00240 (2020 - 2022).

Results: we have detected an increase in circulating MVEs levels in CKD patients, compared to the control group (171 MVEs / μ l [119.5 - 241] vs 68.5 MVEs / μ l [55 - 115], $p < 0.001$). We have not observed a linear relationship with the loss of estimated glomerular filtration in stages 2 to 5 of CKD. Likewise, we did not find any association with the etiology of CKD or with associated cardiovascular comorbidity (ischemic heart disease, peripheral arthropathy and HTA). Other conventional cardiovascular risk factors such as tobacco and alcohol do not determine differences in MVEs levels. However, if we have verified that diabetic patients present lower levels of circulating MVEs than non-diabetics, 228 MVEs / μ l [159 - 257] vs 127 MVEs / μ l [92.5 - 163.5] $p < 0.05$. There is a negative correlation between age and the levels of MVEs (Spearman test $p < 0.05$). The group of the 2nd tertile > 50 years and 3rd tertile > 70 years had lower levels of MVE $p < 0.001$ (group 1 vs 3 $p < 0.002$ / group 2 vs 3 $p < 0.001$). Finally, the MVEs maintain a linear relationship with the serum total cholesterol values $p < 0.02$. On the other hand, we observe a trend towards high levels of AOPP in CKD, but without showing any correlation with circulating MVEs. There is also no linear correlation between MVE and VEGF.

Chronic treatment with hemodialysis does not restore MVEs to normal. Thus, the levels of MVEs in dialysis patients remain elevated even more than in the previous stages of CKD without dialysis: HD 470 MVEs / μL [60 – 1800] vs CKD 171 MVEs / μL [119.5 - 241], no significant differences. The analysis of the MVEs values throughout a hemodialysis session shows that this method of correction of uremia, analyzed in isolation, also fails to restore the levels of MVEs (PreHD levels 375 MVEs / μL [50 - 1500] and PostHD levels 155 MVEs / μL [40 - 230], Friedman test p 0.3).

We have analyzed the effect of the usual drugs in clinical practice in the non-dialysis CKD population and found that the association of statins and antiplatelet agents significantly reduces the amount of MVEs. Thus, the circulating levels of MVEs in each therapeutic group are significantly reduced, compared to the reference of the untreated ones. Those who receive statins have 169.5 MVEs / μL [132 – 239.5], antiplatelet drugs 138 MVEs / μL [118 – 161.5] and both drugs 93 MVEs / μL [71 - 120] versus 230 MVEs / μL [201 - 255] untreated, $p < 0.001$ according to the Kruskal-Wallis test. The effect of both therapeutic groups on the reduction of MVEs levels seems to be independent of the reduction of total serum cholesterol ($\beta = -97.81$ CI – 181.8711 a – 13.75).

In the *in vitro* study, we observed that the plasma of patients with CKD at any stage induced an increase in the expression of ICAM and VCAM in the HUVEC cell cultures ($p < 0.006$) compared to the control group. Microvesicles do not seem to have an effect on VCAM but they do have on ICAM in cell cultures, decreasing their presence in all groups. Plasma from patients with CKD at any stage induced lower cell proliferation in HUVEC cell cultures and the presence of MV accentuated these results. Plasma from patients with CKD induced an increase in the rate of apoptosis in all groups (p 0.05). Both the Pre and Post HD plasma pools were the ones that induced the highest apoptosis rate with respect to CKD and peritoneal dialysis (p 0.05). The presence of microvesicles increased this apoptosis rate in all groups except the one with PD (p 0.05).

Conclusions: we describe for the first time, that CKD patients present high levels of circulating MVEs in a similar way to that described in heart disease without having a linear association with the activation of VEGF and AOPPs. Given the high cardiovascular risk in patients with CKD, the search for early biomarkers and possible therapeutic targets such as MVEs could be of vital importance. In our pilot study we see how CKD patients express elevated circulating levels of MVEs and AOPP as a reflection of endothelial involvement, without maintaining a linear relationship between each other. We have reasons to think that this elevation of MVEs is a compensatory mechanism that tries to maintain the homeostasis of the organism, through an intercellular

communication network that activates all the possible mediators involved in endothelial repair. The diabetic population has presented fewer MVEs, findings that do not agree with previous studies, probably due to drugs commonly used in this population to reduce cardiovascular risk.

Statins and antiplatelet agents used in CKD associate a reduction in the values of circulating MVEs almost to the values of the healthy population. Age also seems to be a determining factor in the number of MVEs. There is no relationship between MVEs and VEGF, AOPP, or other acute-phase reactant markers. This finding suggests, once again, that early role of these markers, which perhaps interact as a first-call care team at the endothelium.

The correction of the uremic state with dialysis does not modify the levels of MVEs, even raises them more. This could depend on an even more reduced kidney function, and on multiple other factors such as the dialysis technique, the membranes used in the filter or the vascular access, among others. Given this enormous variability, we were unable to find a linear relationship with any of these factors. Statins and antiplatelet drugs do not maintain their effect at the endothelial microvesicles in HD patients.

Finally, serum from patients with kidney disease associated with diabetes induces proliferation and apoptosis of the endothelium by activating adhesion molecules, and these mechanisms are also influenced by the presence or not of microvesicles. More studies are needed to distinguish whether MVEs are themselves effectors of endothelial damage or simply surrogate biomarkers.

Agradecimientos

A los Doctores José María Portolés Pérez y María Márques Vidas, directores e impulsores en este camino de la investigación que representa esta tesis.

A la Doctora Paula López Sánchez, pilar fundamental en el desarrollo de esta tesis, sobretodo esas largas tardes estadísticas.

Al magnífico equipo del departamento de Biología de Sistemas de la Universidad Alcalá, liderado por los Doctores Rafael Ramírez Chamond y Matilde Alique, así como a todos los que han formado parte de este maravilloso proyecto: Carlos Luna, Lourdes Bohórquez Magro y los que no están en estas líneas, pero de los que no me olvido.

A los colegas del Hospital Universitario Infanta Leonor compañeros en este proyecto de investigación.

A mi familia que no ha dejado de apoyarme en ningún momento ayudándome a llegar donde estoy ahora.

A todos mis camaradas del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, tanto equipo médico como enfermería, por siempre tenderme una mano.

A Luka con su infinita sonrisa, que es capaz de animar a cualquiera, incluso en los peores momentos.

A Darío mi eterno compañero de vida, sin ti esto no sería posible.

Gracias a todos y cada una de las personas que de una u otra manera han contribuido a la finalización de este proyecto.

Abreviaciones

AGEs: productos finales de glicación avanzada	eNOS: óxido nítrico sintasa endotelial
AINEs: antiinflamatorios no esteroideos	ENRICA-RENAL: Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España – Renal
AOPP: productos avanzados de oxidación proteica	EPC: proteína C endotelial
ARA II: antagonistas de los receptores de la angiotensina II	EPCR: receptor de la proteína C endotelial
BH4: Tetrahidrobiopterina	EPIRCE: Epidemiología de la Insuficiencia Renal Crónica en España
C-G: Cockcroft-Gault	ERBP: European Renal Best Practice
CASP3: caspasa 3	ERC: enfermedad renal crónica
CD146: molécula de adhesión de células de melanoma	FBS: suero bovino fetal
CEIM: Comité Ético de Investigación con medicamentos	FGe: filtrado glomerular estimado
CI: consentimiento informado	FGF 23: factor de crecimiento fibroblástico 23
CKD-EPI: Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration	FITC: isotiocianato de fluoresceína
CKD-EPI: Chronic Kidney Disease- Epidemiology Collaboration	FRR: función renal residual
CKD-MBD: Chronic Kidney Disease- Mineral and Bone Disorder	GFR: glomerular filtration rate.
CKD: chronic Kidney Disease;	GTP: guanosín trifosfato
CT: colesterol total	H ₂ O ₂ : peróxido de hidrogeno
DE: desviaciones estándar	HCO: membrana de alto poro
DM: diabetes mellitus	HD: hemodiálisis
DNA: ácido desoxirribonucleico	HDF: hemodiafiltración
DP: diálisis peritoneal	HOPE: Heart Outcomes Prevention Evaluation
E-selectin: selectina endotelial	HTA: hipertensión arterial
ECV: enfermedad cerebro vascular	HUIL: Hospital Universitario Infanta Leonor
EDTA: etilendiaminotetraacético	HUPHM: Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda

HUVEC: células endoteliales de la vena umbilical humana

ICAM-1: molécula de adhesión intercelular-1

ICC: insuficiencia cardíaca congestiva

IDMS: espectrometría de masas con dilución isotópica

IECA: inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina

IL: Interleucina

IMC: índice de masa corporal

IMC: índice de masa corporal

IP: ioduro de propidio

KDIGO: Kidney Disease Improving Global Outcomes

KDOQUI: Kidney Disease Outcomes Quality Initiative

LAMP1: proteína 1 de membrana asociada a lisosomas

lncRNAs: ácido ribonucleico largos no codificantes

Lp[a]: lipoproteínas a

MCP-1: proteína quimiotáctica de monocitos-1

MDRD: Modification of Diet in Renal Disease

MFI: intensidad media de la fluorescencia

MMP: metaloproteinasas de matriz

mRNA: RNA mensajero

MV: microvesículas

MVEs: microvesículas liberadas del endotelio

NADPH oxidasa: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa

NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

NO: óxido nítrico

O₂: oxígeno molecular

O²⁻: anión superóxido

OH⁻: radical hidroxilo

OMS: Organización Mundial de la Salud

ONT Organización nacional de trasplante

PBS: tampón fosfato salino

PCNA: antígeno nuclear de células en proliferación

PCR: proteína C reactiva

PECAM-1: molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas 1

PIGF: factor de crecimiento placentario

Pro / Cro: proteína en orina / creatinina en orina

PS: fosfatidilserina

PTHr: hormona paratiroidea

Qb: flujo sanguíneo

RNA: ácido ribonucleico

ROCK-1: Rho-quinasa 1

ROS: especies reactivas del oxígeno

RTKs: tirosina cinasa

SEN: Sociedad española de nefrología

siRNAs: ácido ribonucleico pequeño de interferencia

TM: trombomodulina

TNF: factor de necrosis tumoral

TSG101: gen 101 de susceptibilidad tumoral.

TSR: terapia sustitutiva renal

uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa

uPAR: Receptor de activador del plasminógeno tipo uroquinasa

VCAM-1: molécula de adhesión de la célula vascular-1

VE-cadherina: cadherina del endotelio vascular

VEGF-R2: Receptor del factor de crecimiento vascular endotelial vascular

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

Figuras

FIGURA 1. GRÁFICO QUE DEMUESTRA EL TAMAÑO DEL PORO DE LOS DIFERENTES TIPOS DE DIALIZADORES EN MERCADO ACTUAL	39
FIGURA 2. PROCESO DE LIBERACIÓN Y FORMACIÓN DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.	46
FIGURA 3. REPRESENTACIÓN DE LAS MICROVESÍCULAS COMO “DUST” POLVO CELULAR.	48
FIGURA 4. DIFERENTES VÍAS UTILIZADAS POR LAS MICROVESÍCULAS PARA LA TRANSFERENCIA INTERCELULAR DE INFORMACIÓN.	49
FIGURA 5. REPRESENTACIÓN DE LOS DIFERENTES ESTÍMULOS CONOCIDOS POR AUMENTAR LA LIBERACIÓN DE MVES EN CULTIVOS CELULARES Y SUS FUNCIONES BIOLÓGICAS PARADÓJICAS.	50
FIGURA 6. REPRESENTACIÓN DE LAS MÚLTIPLES MOLÉCULAS TRANSPORTADAS POR LA MVES Y SUS EFECTOS BIOLÓGICOS ASOCIADOS.....	53
FIGURA 7. IMAGEN QUE REPRESENTAN LOS TIPOS DE VEGF Y SUS RECEPTORES.....	55
FIGURA 8. ESQUEMA DEL CIRCUITO DE RECOLECCIÓN DE MUESTRAS, ALMACENAMIENTO Y PROCESADO.	67
FIGURA 9. DOT PLOT (DIAGRAMA DE PUNTOS) OBTENIDO POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE MICROVESÍCULAS.	69
FIGURA 10. ESQUEMA DEL ESTUDIO REALIZADO IN VITRO EN PACIENTES CON NEFROPATÍA DIABÉTICA.	72
FIGURA 11. IMAGEN DE DOT PLOT OBTENIDO POR CITOMETRÍA DE FLUJO PARA VALORAR LA APOPTOSIS.	75
FIGURA 12. NIVELES DE MVES EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS.	81
FIGURA 13. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE MVES Y EL ESTADIO DE ERC NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS.	82
FIGURA 14. NIVELES DE MVES Y LAS DIFERENTES COMORBILIDADES.	84
FIGURA 15. NIVELES DE MVES Y SU RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL.	85
FIGURA 16. RELACIÓN LINEAL ENTRE LA EDAD Y NIVELES DE MVES. GRÁFICO DE PUNTOS Y LÍNEA DE REFERENCIA.....	85
FIGURA 17. NIVELES DE MVES Y LA EDAD.	86
FIGURA 18. CORRELACIÓN LINEAL ENTRE NIVELES DE MVES Y PARÁMETROS ANALÍTICOS.....	88
FIGURA 19. CORRELACIÓN LINEAL ENTRE NIVELES DE MVES Y NIVELES DE COLESTEROL.	89
FIGURA 20. NIVELES DE AOPP EN LA POBLACIÓN ERC NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS.	90
FIGURA 21. NIVELES DE AOPP EN LA POBLACIÓN DIABÉTICA CON ERC NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS.....	90
FIGURA 22. RELACIÓN DE LAS MVES Y AOPP EN LA ERC NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS.	91
FIGURA 23. NIVELES DE VEGF EN LA ERC NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS.....	92
FIGURA 24. NIVELES DE VEGF EN LA POBLACIÓN DIABÉTICA CON ERC NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS.	92
FIGURA 25. RELACIÓN CON MVES Y VEGF EN LA ERC NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS.	93
FIGURA 26. NIVELES DE MVES Y TRATAMIENTO MÉDICO RECIBIDO EN LA ERC NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS.	94
FIGURA 27. NIVELES DE MVES EN PACIENTES ERC NO DEPENDIENTES DE DIÁLISIS EN TRATAMIENTO CON ESTATINA Y ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS.	95
FIGURA 28. NIVELES DE MVES SEGÚN TRATAMIENTO MÉDICO RECIBIDO Y TERCILES DE EDAD EN PACIENTES ERC NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS.....	98
FIGURA 29. NIVELES DE AOPP EN PACIENTES ERC NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS EN TRATAMIENTO CON ESTATINA Y ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS.	99

FIGURA 30. NIVELES DE VEGF EN PACIENTES ERC NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS EN TRATAMIENTO CON ESTATINA Y ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS.	99
FIGURA 31. NIVELES DE MVES EN PACIENTES EN HEMODIÁLISIS.	102
FIGURA 32. NIVELES DE MVES PRE Y POST HEMODIÁLISIS.	103
FIGURA 33. RELACIÓN ENTRE LOS NIVELES DE MVES Y PARÁMETROS ANALÍTICOS EN PACIENTES EN HEMODIÁLISIS.	104
FIGURA 34. NIVELES DE MVES EN PACIENTES EN TRATAMIENTO CON ESTATINAS Y ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS EN PACIENTES EN HEMODIÁLISIS.	107
FIGURA 35. HISTOGRAMAS OBTENIDOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO PARA ICAM Y VCAM EN LOS DIFERENTES GRUPOS A ESTUDIO	108
FIGURA 36. VALORES DE VCAM E ICAM OBTENIDOS EN LOS CULTIVOS CELULARES AL EXPONERLO A PLASMA DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE ERC.	109
FIGURA 37. NIVELES DE ICAM AL EXPONERSE A PLASMA DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE ERC CON Y SIN MICROVESÍCULAS.	110
FIGURA 38. PORCENTAJE DE PROLIFERACIÓN CELULAR AL EXPONERSE A PLASMA DE LOS DIFERENTES ESTADIOS DE ERC.	111
FIGURA 39. PORCENTAJE DE PROLIFERACIÓN CELULAR AL EXPONERSE A PLASMA CON Y LIBRE DE MICROVESÍCULAS.	111
FIGURA 40. PORCENTAJE DE APOPTOSIS EN LOS DIFERENTES GRUPOS.	112
FIGURA 41. PORCENTAJE DE APOPTOSIS AL EXPONERSE A PLASMA CON Y LIBRE DE MICROVESÍCULAS.	113

Tablas

TABLA 1. CLASIFICACIÓN DE LOS ESTADIOS DE ERC SEGÚN ERC Y ALBUMINURIA.....	34
TABLA 2. CARACTERÍSTICAS DE LOS DISTINTOS TIPOS DE VESÍCULAS EXTRACELULARES.....	47
TABLA 3. ESTÍMULOS DE LIBERACIÓN DEL VEGF.....	56
TABLA 4. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA POBLACIÓN A ESTUDIO EN ERC NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS.	80
TABLA 5. PRESCRIPCIÓN DE LOS DISTINTOS FÁRMACOS DE LA MUESTRA DE ESTUDIO CON ERC NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS.	81
TABLA 6. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES DIABÉTICOS Y NO DIABÉTICOS CON ERC NO DEPENDIENTE DE DIÁLISIS.	87
TABLA 7. REGRESIÓN LINEAL, ENTRE NIVELES DE MVES Y EL TRATAMIENTO CON ESTATINAS Y ANTIAGREGANTES PLAQUETARIOS, AJUSTADO POR COLESTEROL.	96
TABLA 8. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES SEGÚN TRATAMIENTO RECIBIDO.	97
TABLA 9. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES EN HEMODIÁLISIS.	101
TABLA 10. PREVALENCIA DE LOS DISTINTOS FÁRMACOS DE LA MUESTRA DE ESTUDIO EN HEMODIÁLISIS.	102
TABLA 11. CARACTERÍSTICAS BASALES DE LOS PACIENTES EN HEMODIÁLISIS SEGÚN SU TRATAMIENTO RECIBIDO.....	106

Índice

RESUMEN	5
ABSTRACT	9
AGRADECIMIENTOS.....	13
ABREVIACIONES	15
FIGURAS	19
TABLAS	22
INTRODUCCIÓN	28
1.1. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	29
1.2. DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	32
1.3. CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.....	33
1.4. ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA AVANZADA	35
1.4.1. PATOLOGÍA ASOCIADA A LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA AVANZADA.....	35
1.5. TIPOS DE TERAPIA SUSTITUTIVA RENAL	37
1.6. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	38
1.7. ESTRÉS OXIDATIVO, INFLAMACIÓN Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	41
1.8. MARCADORES DE DAÑO ENDOTELIAL	45
1.8.1. VESÍCULAS EXTRACELULARES	45
1.8.2. MICROVESÍCULAS	47
1.8.3. FORMACIÓN DE LAS MICROVESÍCULAS	48
1.8.4. COMPOSICIÓN DE LAS MICROVESÍCULAS	48
1.8.5. MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES.....	50
1.8.6. MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES COMO BIOMARCADORES Y MEDIADORES DE DAÑO VASCULAR	51
1.8.7. MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES Y ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA.....	54
1.8.8. MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES Y FACTORES CRECIMIENTO ENDOTELIAL	55
HIPÓTESIS.....	58
OBJETIVOS.....	60
MATERIAL Y MÉTODOS.....	62
4.1. TIPO DE ESTUDIO	63
4.2. ESTUDIO <i>IN VIVO</i>	63
4.2.1. MUESTRA DE LOS PACIENTES	63
4.2.2. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN.....	63
4.2.3. VARIABLES CLÍNICAS	64
4.2.4. OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS SANGUÍNEAS	66
4.2.5. GESTIÓN DE MUESTRAS Y MÉTODOS REALIZADOS	67
4.2.5.1. RECOLECCIÓN DE SANGRE, AISLAMIENTO Y ANÁLISIS POR CITOMETRÍA DE FLUJO DE MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES	68
4.2.5.2. PRODUCTOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN PROTEICA Y FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR	69

4.3.	ESTUDIO <i>IN VITRO</i>	71
4.3.2.	AISLAMIENTO DE MICROVESÍCULAS DEL PLASMA	71
4.3.3.	POOL DE MICROVESÍCULAS.....	72
4.3.4.	CULTIVOS CELULARES.....	72
4.3.5.	PROLIFERACIÓN CELULAR	73
4.3.6.	APOPTOSIS	74
4.3.7.	EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN INTERCELULAR Y LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN DE LA CÉLULA VASCULAR	75
4.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	76
	RESULTADOS	77
5.1.	NIVELES DE MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA COMO MARCADOR PRECOZ DE INFLAMACIÓN Y DAÑO ENDOTELIAL.....	78
5.1.1.	CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.....	79
5.1.2.	NIVELES DE MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	81
5.1.3.	MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES Y SU RELACIÓN CON EL GRADO DE ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA	82
5.2.	RELACIÓN DE LAS MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES Y OTROS PARÁMETROS ANALÍTICOS Y BIOMARCADORES ASOCIADOS A LA DISFUNCIÓN ENDOTELIAL.....	87
5.2.1.	MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES Y PARÁMETROS ANALÍTICOS	87
5.2.2.	PRODUCTOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN PROTEICA EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y SU RELACIÓN CON LAS MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES	89
5.2.3.	FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR EN LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA Y SU RELACIÓN CON LAS MVES.....	91
5.3.	REPERCUSIÓN DE LOS MEDICAMENTOS HABITUALES SOBRE LAS MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES Y OTROS MARCADORES.....	93
5.3.1.	NIVELES DE MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES Y TRATAMIENTO MÉDICO RECIBIDO.....	93
5.3.2.	NIVELES DE PRODUCTOS AVANZADOS DE OXIDACIÓN PROTEICA SEGÚN TRATAMIENTO RECIBIDO	98
5.3.3.	NIVELES DE FACTOR DE CRECIMIENTO ENDOTELIAL VASCULAR Y TRATAMIENTO RECIBIDO	98
5.4.	LAS MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES Y LA HEMODIÁLISIS	100
5.4.1.	CARACTERÍSTICAS BASALES DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.....	100
5.4.2.	NIVELES DE MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES EN LOS PACIENTES EN HEMODIÁLISIS.....	102
5.4.3.	NIVELES DE MICROVESÍCULAS ENDOTELIALES Y TRATAMIENTO MÉDICO RECIBIDO EN PACIENTES EN HEMODIÁLISIS.....	105
5.4.4.	ANALIZAR <i>IN VITRO</i> EL EFECTO DE LAS MICROVESÍCULAS DE PLASMA DE PACIENTES CON NEFROPATÍA DIABÉTICA SOBRE LA CÉLULA ENDOTELIAL.....	107
5.4.5.	MODELO <i>IN VITRO</i> DEL PLASMA DE LOS PACIENTES CON NEFROPATÍA DIABÉTICA Y MOLÉCULAS DE ADHESIÓN	108
5.4.6.	PROLIFERACIÓN	111
5.4.7.	APOPTOSIS	112
	DISCUSIÓN	114
	CONCLUSIONES	128

BIBLIOGRAFÍA.....	131
ANEXOS.....	144
ANEXO 1. APROBACIÓN POR EL COMITÉ DE ÉTICA DE LA INVESTIGACIÓN CON MEDICAMENTOS	145
ANEXO 2. RESUMEN DEL PROYECTO FIS PI14 / 00806	146
ANEXO 3. RESUMEN DEL PROYECTO FIS PI19 / 00240	147
ANEXO 4. CONSENTIMIENTOS INFORMADOS	148
ANEXO 5. COMUNICACIONES Y PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS.....	154

Introducción

1.1. Enfermedad Renal Crónica

La enfermedad renal crónica (ERC) es un término genérico que define un conjunto de enfermedades heterogéneas que afectan la estructura y función renal¹.

En el año 2012, las Guías KDIGO (Kidney Disease Improving Global Outcomes) definen la ERC como la presencia durante al menos 3 meses de un filtrado glomerular estimado (FGe) inferior a 60 ml/min/1,73m² o una lesión renal definida por la presencia de anormalidades estructurales o funcionales del riñón, que puedan provocar potencialmente un descenso del FGe. Esta lesión renal puede ser objetivada por biopsia renal o mediante signos indirectos de daño renal como la albuminuria, alteraciones en el sedimento urinario, alteraciones hidroelectrolíticas o a través de una prueba de imagen². Aunque también se consideran estadios de daño renal precoz aquellos con FGe entre los 90 y 60 ml/min/1,73m², el aumento de riesgo de mortalidad y eventos cardiovasculares se ha relacionado con FGe por debajo de 60 ml/min/1,73m². A pesar de ello, con el transcurso del tiempo vemos como este límite ha ido aumentando, recalcando la importancia de un abordaje precoz para evitar posteriores complicaciones^{3,4}.

La ERC constituye un grave problema de salud en el sistema sanitario español. En el año 2010 se publicaron los resultados del estudio EPIRCE (Epidemiología de la Insuficiencia Renal Crónica en España) diseñado para conocer la prevalencia de la ERC. Se estima que en España, aproximadamente el 10 % de la población adulta sufre algún grado de ERC y este porcentaje aumenta hasta un 20 % en la población mayor de 60 años⁵.

Más recientemente, el estudio ENRICA-RENAL (Estudio de Nutrición y Riesgo Cardiovascular en España - Renal) ha situado la prevalencia de la ERC en España en el 15,1 %, por encima de la estimada por The Global Kidney Health Atlas. El sexo y la edad son claros determinantes de la prevalencia de ERC. Al separar por sexos, la ERC es más prevalente en hombres que en mujeres, 23,1 % frente al 7,3 % y si clasificamos en estratos de edad, los mayores de 65 años tiene una prevalencia treinta puntos porcentuales mayor que los menores de 44 años⁶. La ERC es ya la octava causa de muerte en España en 2016 y está llamada a ser la segunda causa de muerte en nuestro país, solo por detrás del Alzheimer a final del presente siglo⁷.

La ERC constituye un problema emergente en todo el mundo, con una prevalencia creciente. Esto es debido en parte a su infradiagnóstico en el pasado y al aumento de factores de riesgo que la promueven como la diabetes mellitus (DM), la

obesidad o la hipertensión arterial (HTA) entre otros. Tenemos datos muy precisos de la prevalencia de ERC en fases avanzadas, ya que disponemos de un registro de pacientes en diálisis y/o con un trasplante renal que es obligatorio por ley. Cada paciente con tratamiento sustitutivo renal (TSR) está recogido en alguno de los registros autonómicos españoles. Los datos se comunican anualmente de forma agregada a nivel nacional y se reportan al registro europeo. Gracias a ello podemos constatar que los pacientes que requieren TSR han crecido en España en la última década un 23 %^{8,9}.

Los datos del Registro de la Sociedad Española de Nefrología (SEN) y la Organización Nacional de Trasplantes (ONT) muestran un aumento de los nuevos pacientes que precisan TSR. En los últimos diez años se ha incrementado en un 15 %, pasando de 130 personas por millón de población en 2006 a 142 en 2016 y siendo el grupo de edad con más incidencia el de mayores de 75 años⁸.

Intentar prevenir y controlar la ERC, para evitar llegar a sus estadios más avanzados resulta, por tanto, una prioridad en la planificación del sistema sanitario, no solo por objetivos de salud, sino también por su propia sostenibilidad. El 0,1 % de la población, precisa de un TSR (46.000 pacientes) consumiendo así más del 2,5 % del presupuesto sanitario. El coste medio anual por paciente tratado con hemodiálisis es de 46.659,83 € y de 32.432,07 € en diálisis peritoneal⁹. Este impacto es todavía mayor si se consideran los costes derivados de la hospitalización, que según un reciente estudio incrementarían en 12.006 € por año, o los costes indirectos de transporte, horas perdidas por paciente o acompañante y atenciones urgentes, que nunca han sido adecuadamente evaluados¹⁰.

Con los datos previamente descritos no es de extrañar que siempre haya sido primordial por parte de nefrólogos buscar nuevas dianas terapéuticas o marcadores precoces para intentar evitar la progresión hacia la enfermedad renal terminal. Está descrito que la media para alcanzar un estadio de enfermedad renal terminal se aproxima a los 15 años.

Tanto la estrategia nacional para el manejo de la ERC como el plan estratégico en nefrología de nuestra comunidad señalan como pilares básicos la detección precoz, sobre todo en grupos de riesgo, así como fomentar hábitos de vida saludable.

Se considera población de riesgo susceptible de cribado precoz a los pacientes con antecedentes de HTA, DM tipo 2 o enfermedad cardiovascular establecida. También se deben incluir las personas de más de 60 años, obesos con un índice de masa corporal

(IMC) > 35 kg/m², DM tipo 1 con más de 5 años de evolución, familiares de primer grado de pacientes con enfermedad renal o enfermedad renales hereditarias, enfermedades obstructivas del tracto urinario, pacientes en tratamiento prolongado con fármacos nefrotóxicos incluidos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), sujetos con otros factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, antecedentes de insuficiencia renal aguda, así como aquellos con infecciones crónicas, enfermedades autoinmunes y neoplasias. Esta evaluación debería realizarse estimando el FGe y la albuminuria, de manera simultánea, al menos una vez al año y si existen alteraciones, debe confirmarse en dos determinaciones sucesivas¹.

Un factor fundamental a tener en cuenta en la progresión de la ERC es la etiología de base. En el último informe SEN / ONT, las causas más frecuentes de ERC que progresan hasta la necesidad de TSR son la nefropatía diabética, enfermedad vascular arteriosclerótica, nefroangiosclerosis, nefropatía isquémica, enfermedad glomerular primaria o secundaria a enfermedad sistémica, las nefropatías congénitas y hereditarias y las nefropatías intersticiales⁸. De esta manera podemos establecer una velocidad de progresión esperable para cada enfermedad que puede acelerarse por insultos intercurrentes o frenarse por medidas de protección renal. La DM representa el 24 % entre las causas de enfermedad renal primaria¹.

A parte de la etiología, se han identificado varios factores comunes que pueden acelerar la progresión de la enfermedad renal. Dentro de estos factores existen elementos no modificables, como el grado de función renal en el momento del diagnóstico, la raza, el sexo, la edad, el peso al nacimiento y otros factores genéticos. Más interesantes resultan los factores modificables como: nivel de proteinuria, presión arterial elevada, mal control glucémico, tabaquismo, obesidad, síndrome metabólico/resistencia a la insulina, dislipemia, anemia, factores metabólicos (calcio/fósforo; ácido úrico) y uso de nefrotóxicos¹¹.

Como podemos observar, la mayoría de los factores de progresión modificables de la enfermedad renal, también son considerados factores clásicos de riesgo cardiovascular. No es de extrañar, pues la estructura renal es fundamentalmente vascular y se ve expuesta a los mismos elementos de daño. Nuestro objetivo es intervenir en estos factores de manera precoz e intensiva y así evitar la progresión a una enfermedad renal crónica avanzada.

1.2. Diagnóstico de la Enfermedad Renal Crónica

Para realizar un diagnóstico de ERC utilizamos la estimación del filtrado glomerular (FGe) a partir de ecuaciones. Se recomienda utilizar las ecuaciones obtenidas a partir de la medida de la concentración de creatinina sérica, la edad, el sexo y la etnia. Estas ecuaciones son más exactas que la medida de la creatinina sérica aislada^{12,13}.

La más utilizada sobretodo en estudios epidemiológicos que estudian la prevalencia de la ERC son las derivadas del estudio *Modification of Diet in Renal Disease (MDRD)*^{14,15}, *MDRD-4* o *MDRD-IDMS* (espectrometría de masas con dilución isotópica). Uno de los inconvenientes de esta fórmula es que conlleva a una infraestimación del FGe en el rango de valores elevados, debido a que se han utilizado distintos métodos de medida, según que laboratorios en individuos con cierto grado de insuficiencia renal¹⁴. Por ello, solo se obtienen valores exactos cuando el FGe es menor de 60 ml/min/1,73 m², por lo que no es recomendable utilizar este tipo de ecuaciones en pacientes con filtrados más elevados.

La ecuación CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease-Epidemiology Collaboration*)¹⁶, proporciona ventajas adicionales respecto al MDRD-IDMS, dado que tiene una mayor exactitud y mejora la capacidad predictiva del FGe (especialmente entre valores de 60 y 90 ml/min/1,73 m²), así como la predicción de mortalidad global y cardiovascular o del riesgo de presentar enfermedad renal crónica terminal¹⁷. Esta ecuación ha mostrado su superioridad frente a otras de estimación del filtrado glomerular basadas en la concentración sérica de creatinina (MDRD), cistatina C o en la combinación de ambas¹⁸. Por ello es la ecuación actualmente recomendada para definir estrategias de planificación e intervención en planes de salud renal.

El uso de la ecuación de Cockcroft-Gault (C-G)¹⁹, debería desaconsejarse debido a que no ha sido reformulada para valores de creatinina obtenidos por procedimientos adecuados y no puede ser re-expresada para los métodos de medida de creatinina utilizados en la actualidad¹.

Como se comentaba en párrafos anteriores en la definición de la enfermedad renal crónica, la presencia de alteraciones en sedimento urinario es de vital importancia, así como la valoración de proteinuria con la recogida de orina de 24 horas o realizando un cociente albuminuria/creatinina. Como veremos más adelante, este valor es necesario tanto para la clasificación de la enfermedad renal crónica como para predecir su pronóstico.

1.3. Clasificación de la Enfermedad Renal Crónica

Una vez diagnosticada la ERC debemos clasificarla por niveles. Existe la clasificación clásica de la ERC en diferentes estadios clínicos basados en el FGe obtenido por medio de las distintas fórmulas. Es importante recalcar que para establecer el grado de ERC es preciso un tiempo mínimo de 3 meses, con el fin de evitar fallos de medición en pacientes con insuficiencia renal aguda. Todas estas fórmulas de estimación no se pueden utilizar en situaciones de fallo renal agudo.

Los casos con FGe entre 60 - 89 ml/min/1,73m², sin datos de lesión renal (proteinuria/ albuminuria elevada, sedimento y prueba de imagen normales), son considerados como filtrado glomerular alterado. Los estadios 3-5 son los que corresponderían a la definición antiguamente establecida de insuficiencia renal crónica ampliamente utilizada en nuestro medio. Si el paciente se encuentra en algún programa de diálisis, al estadio 5 se le añade una D (estadio 5D) y si se trata de pacientes trasplantados renales, a los estadios se les añade la letra T después de cada número (1T, 2T, 3T, 4T y 5T).

Las Guías KDIGO²⁰ en el año 2012 proponen una clasificación más completa donde se toma a consideración el valor de la albuminuria, dividiéndola en 3 estadios: A1, A2, A3, según el cálculo obtenido de la relación albúmina / creatinina (*Tabla 1*). Obteniendo de esta forma un perfil de riesgo relativo para 5 variables (mortalidad global, mortalidad cardiovascular, fracaso renal tratado con diálisis o trasplante, fracaso renal agudo y progresión de la enfermedad renal). Se insiste mucho en estas guías sobre la importancia de la diferenciación de los estadios 3a (FGe 45-59 m/min/1.73 m²) y el 3b (FGe 30-44 m/min/1.73 m²). Debido a las variaciones respecto al riesgo y mortalidad entre estos dos grupos. Asimismo, recomiendan dejar atrás los términos de micro y macroalbuminuria²⁰ dado que el expresar “micro” nos da una sensación errónea de menor riesgo de progresión, nada más lejos de la realidad. En esta actualización de Guías KDIGO resalta además el valor de la albuminuria/proteinuria como factor de riesgo pronóstico. Si nos fijamos en la *Tabla 1*, de la clasificación de la ERC y de riesgo con escala de colores, vemos claramente que el riesgo de un paciente con FGe 85 ml/min y una proteinuria severa (> 300 mg/g) es similar al de una paciente con FGe de 35 ml/min y sin proteinuria.

La progresión de la ERC varía dependiendo de diferentes factores. Se define como progresión de la ERC a un descenso sostenido del FGe $> 5 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ al año o por el cambio de categoría (de G1 a G2, de G2 a G3a, de G3a a G3b, de G3b a G4 o de G4 a G5), siempre que este se acompañe de una pérdida de FGe $\geq 5 \text{ ml/min/1,73 m}^2$ ²¹. Debemos descartar factores potencialmente reversibles de agudización siempre que sea posible²².

Tabla 1. Clasificación de los estadios de ERC según ERC y albuminuria.

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				Persistent albuminuria categories Description and range		
				A1	A2	A3
				Normal to mildly increased	Moderately increased	Severely increased
				$<30 \text{ mg/g}$ $<3 \text{ mg/mmol}$	$30\text{-}300 \text{ mg/g}$ $3\text{-}30 \text{ mg/mmol}$	$>300 \text{ mg/g}$ $>30 \text{ mg/mmol}$
GFR categories (ml/min/1.73 m ²) Description and range	G1	Normal or high	≥ 90			
	G2	Mildly decreased	60-89			
	G3a	Mildly to moderately decreased	45-59			
	G3b	Moderately to severely decreased	30-44			
	G4	Severely decreased	15-29			
	G5	Kidney failure	<15			

Green: low risk (if no other markers of kidney disease, no CKD); Yellow: moderately increased risk; Orange: high risk; Red, very high risk.

CKD: Chronic Kidney Disease; GFR: Glomerular filtration rate. Imagen tomada de Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD Work Group. Kdigo Clinical practice guideline for the management of blood pressure in Chronic Kidney disease. Kidney Int Suppl 2012; 2 : 3337 - 414).

1.4. Enfermedad Renal Crónica Avanzada

A medida que la ERC progresa hacia estadios más avanzados, el seguimiento de nuestros pacientes debe ser más estrecho, intentando controlar todas las complicaciones derivadas de la propia enfermedad como son la anemia, alteración del metabolismo óseo mineral y alteraciones electrolíticas. El seguimiento cercano nos permitirá retrasar al máximo la progresión de la enfermedad, evitando así la necesidad de una TSR.

En la actualidad disponemos de tratamientos farmacológicos y así como una serie de recomendaciones dietéticas fundamentales para un adecuado control de la sintomatología ocasionada por la evolución de la propia enfermedad.

1.4.1. Patología asociada a la Enfermedad Renal Crónica Avanzada

La anemia es una de las complicaciones más frecuentes de la ERC afectando alrededor del 90% de los pacientes con estadios avanzados, aunque puede aparecer desde los estadios más precoces de la enfermedad²³. La causa principal de anemia en la ERC se debe a un déficit de producción de eritropoyetina endógena, cuya función principal es la de actuar sobre la diferenciación y maduración de progenitores hematopoyéticos. Hay estudios que asocian la anemia en los pacientes con ERC a una disminución de la calidad de vida así como un aumento evidente del riesgo cardiovascular^{24,25}. De ahí la importancia que ha supuesto para nuestro grupo de pacientes el tratamiento con agentes estimuladores de la eritropoyesis.

La definición de anemia se establece según unos criterios comunes en la que la concentración de hemoglobina se encuentra dos desviaciones estándar (DE) por debajo de la concentración media de hemoglobina de la población general, corregida para edad y sexo²⁶. Según la Sociedad Española de Nefrología (SEN), la Organización Mundial de la Salud (OMS), la *Kidney Disease Outcomes Quality Initiative* (KDOQI) y la *European Renal Best Practice* (ERBP) se considera anemia en mujeres cuando la concentración de hemoglobina es inferior 11,5 g/dL^{26,27}. En cuanto al límite inferior de la concentración de hemoglobina en hombres de edad inferior a 70 años según la SEN, KDOQI y la ERBP es de 13,5 g/dl y de 13 g/dl según la OMS. En el caso de hombres de edad superior a 70 años la SEN y la OMS fijan los límites inferiores de hemoglobina en 12 g/dL, la KDOQI y la ERBP en 13,5 g/dL. Es importante no confundir los límites de diagnóstico de anemia con los de inicio de tratamiento con agentes eritropoyéticos.

El conjunto de alteraciones del metabolismo óseo mineral se engloba bajo el término anglosajón: CKD-MBD (*Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder*), refiriéndose a las alteraciones del calcio y fósforo, distintos tipos de enfermedad ósea (osteodistrofia renal), hiperparatiroidismo secundario a ERC y calcificaciones coronarias, vasculares o valvulares.

En la práctica clínica como marcadores utilizamos el calcio, fósforo, hormona paratiroidea (PTH) y la vitamina D, aunque en los últimos años se está hablando de otros parámetros de elevación precoz como es el factor de crecimiento fibroblástico 23 (FGF 23)²⁸. En el año 2017 se publicó la actualización de las guías KDIGO de manejo de la CKD-MBD donde se exponen los diferentes valores objetivo para el calcio, el fósforo y la PTH, en función del estadio de ERC²⁹. La estrategia para el control del metabolismo óseo mineral se consigue aplicando tratamientos integrados que incluyen: recomendaciones dietéticas, captores de fósforo, vitamina D nativa, análogos vitamina D y calcimiméticos.

A medida que progresa la ERC se produce una inhabilidad de excretar hidrogeniones, aumenta de la carga ácida endógena por la disminución de síntesis de amonio en el segmento distal de la nefrona y en ocasiones por pérdida renal de bicarbonato apareciendo la acidosis metabólica. A este estado de acidosis se pueden asociar otras alteraciones hidroelectrolíticas como hiperpotasemia o hipernatremia, por lo que en los estadios 4-5 de ERC las recomendaciones dietéticas son fundamentales para su control²⁰.

Las recomendaciones dietéticas no solo pretenden controlar los niveles de electrolitos, sino también el aporte proteico que recibe cada paciente, así como evitar la sobrecarga hídrica. Los principales puntos a tratar en la dieta de un paciente renal son: la ingesta de sodio, para el control de la tensión arterial; disminución de la ingesta de potasio para mantener valores séricos dentro del rango de normalidad; control de aportes de calcio y fósforo, que se destacan como los principales responsables de la calcificación vascular^{30,31}. De vital importancia es el control en la ingesta de proteínas según los distintos estadios de ERC así como en las diferentes TSR³².

Todo lo revisado hasta aquí, nos da una idea de la complejidad que supone realizar estudios clínicos que busquen marcadores de riesgo o nuevas medidas de intervención en pacientes con ERC. En efecto, la ERC aglutina patologías con diferentes velocidades de progresión intrínsecas, que afecta a todos los tramos de edad y asocia con frecuencia comorbilidades de alto riesgo. Para una mayor complejidad, su evolución puede empeorar por factores intercurrentes, inflamaciones o tóxicos o también mejorar

por distintos tratamientos utilizados. Por ello, cuando se pretende trasladar a la clínica los nuevos elementos que identificamos en investigación básica encontramos grandes dificultades. Cada nuevo factor de progresión o diana terapéutica potencial que se identifican modelos de daño renal o vascular en cultivos celulares o animales debe ser trasladado a estudios en humanos.

1.5. Tipos de Terapia Sustitutiva Renal

Un porcentaje elevado de los pacientes con ERC evoluciona hacia los estadios más avanzados de la enfermedad precisando, en la mayoría de los casos, la instauración de una TSR. Si revisamos El Registro de SEN/ONT muestra que, en los últimos años, el número de nuevos pacientes que necesitan TSR se ha incrementado, pasando de 130 (2006) a 147 pacientes por millón de población (2018).

Las diferentes TSR que se ofrecen en la actualidad en España son la hemodiálisis (HD), diálisis peritoneal (DP) y el trasplante renal.

Hay que tener en cuenta la posibilidad del trasplante renal como una de las opciones de TSR. El paciente puede ser estudiado y preparado convenientemente para un posible trasplante renal de donante vivo (si existe esa posibilidad) o de entrar en la lista de espera para un posible trasplante renal de donante cadáver sin que haya iniciado diálisis, lo que se conoce como trasplante renal anticipado.

Respecto a la hemodiálisis y la diálisis peritoneal, es todavía controvertido, el momento idóneo de inicio de un programa de diálisis crónica³³⁻³⁵. Aunque, está claro que la tendencia es a primar cada vez más la sintomatología respecto a los valores analíticos aislados. Por ello, es importante analizar de manera conjunta, tanto los parámetros clínicos como los analíticos y sobre todo no olvidar la situación subjetiva del enfermo. En general, como recomendaciones se inicia diálisis cuando el FGe está situado entre 8 y 10 ml/min/1,73 m² y es mandatorio con FGe < 6 ml/min/1,73 m², incluso en ausencia de sintomatología urémica¹. En los últimos años, también se ha impuesto como una terapia de inicio la diálisis incremental, intentando preservar la función renal residual (FRR) y asegurar calidad de vida^{36,37}.

1.6. Enfermedad Cardiovascular en la Enfermedad Renal Crónica

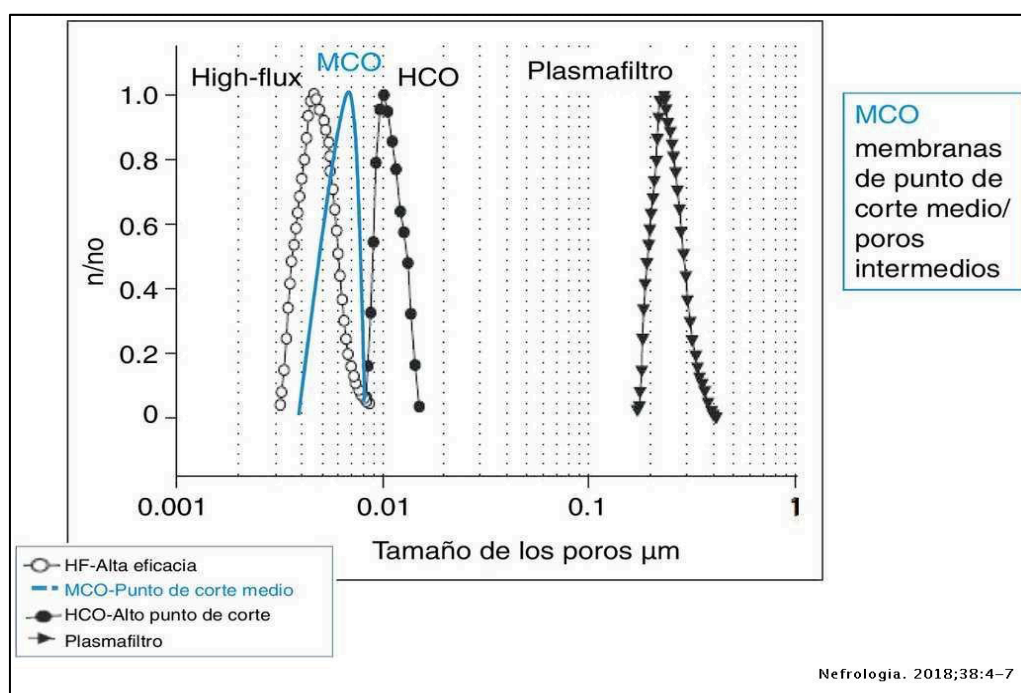
Es conocido, que los pacientes con enfermedad renal crónica, tienen una alta incidencia de enfermedad cardiovascular respecto a la población general³⁸. Es más, los pacientes con insuficiencia renal crónica, tienen más probabilidad de morir por causa cardiovascular que de progresar a insuficiencia renal terminal y requerir una TSR³⁹. Los datos del *Framingham Heart Study* señalaron, por primera vez, la asociación entre la insuficiencia renal y la morbimortalidad cardiovascular^{40,41}. Posteriormente, se comprobó que existe una relación no lineal entre el FGe y el riesgo de muerte, episodios cardiovasculares y hospitalizaciones cuando el FGe se encuentra por debajo de 60 ml/min/m²⁴². En el caso de la insuficiencia cardíaca congestiva (ICC) avanzada el FGe fue mejor predictor de mortalidad que la clase funcional e incluso que la fracción de eyección basal⁴³.

La enfermedad renal crónica y la enfermedad cardiovascular comparten múltiples factores de riesgo cardiovascular clásicos, como diabetes, tabaquismo, hipertensión, hipercolesterolemia y edad. Sin embargo, esto por si solo, no explica la elevada tasa de mortalidad. Asimismo, existen otros factores de riesgo cardiovascular considerados no tradicionales como son: la uremia, alteraciones del metabolismo fósforo-calcio, aumento del estrés oxidativo, malnutrición, hiperhomocisteinemia, disfunción endotelial e inflamación crónica; que podrían explicar esta elevada tasa de mortalidad⁴⁴⁻⁴⁶.

En los estadio precoces, cuando la enfermedad renal todavía no tiene un cuadro muy florido, ya existe una elevada mortalidad por enfermedad cardiovascular⁴⁷. A partir de un FGe de 80,0 ml/min/1.73 m², cada reducción de 10 ml/min/1,73 m² aumenta un 10 % el riesgo de muerte o evento no fatal⁴⁸. Por ello, es fundamental insistir en la investigación de biomarcadores precoces, porque a la vista de los resultados, nuestras actuaciones no son suficientes para evitar esta elevada mortalidad. Si los pacientes alcanzan una técnica dialítica, esta condición de riesgo no mejora, incluso en pacientes jóvenes. Según el registro Americano, la prevalencia de enfermedad cardiovascular era de 51,4 % en paciente sometidos a HD en edades comprendidas entre 22 - 44 años y aumentando con la edad hasta un 67,8 – 81,6 % en mayores de 45 años⁴⁹. En el estudio realizado por Herzog et al, hasta un 40 % de los pacientes que inician tratamiento con HD tienen afección coronaria y el 85 %, alteraciones en la estructura y/o la función del ventrículo izquierdo⁵⁰.

No parece haber diferencias respecto a la supervivencia entre HD y DP. En una cohorte de pacientes en HD, la incidencia de hospitalización por cardiopatía isquémica fue de un 8 % anual, mientras que en los pacientes en DP la aparición de una cardiopatía isquémica de *novo* era de un 8,8 % el primer año y un 15 % a los dos años⁵¹. En los últimos años, se han ido mejorando la calidad de los dializadores, tendiendo al aumento del diámetro de poro y así ser más efectivo dializando moléculas de mediano tamaño, sin permitir el paso de la albúmina. En la *Figura 1* observamos como en los últimos años tenemos a nuestro alcance dializadores específicos para eliminar moléculas de gran tamaño.

Figura 1. Gráfico que demuestra el tamaño del poro de los diferentes tipos de dializadores en mercado actual



n/no: relación del número de poros respecto al tamaño. Imagen tomada de Rafael Pérez-García et al. The dialyser in the year 2017: much more than a membrane. Nefrología. 2018.

Aunque en el último registro americano se detalla una mayor prevalencia de enfermedad cardiovascular en los pacientes en HD siendo de un 79,6 % vs 57,8 % en DP y de tan solo un 41,4 % en pacientes trasplantados. Estos datos tal vez se deban a un sesgo de selección de la técnica.

Como un importante marcador de riesgo, de enfermedad renal y cardiovascular, se ha descrito a la excreción urinaria de albúmina, tanto en pacientes diabéticos como en los no diabéticos⁵². Siendo la albuminuria, el más potente predictor de evolución cardiovascular adversa en diabéticos, muy superior a los otros factores de riesgo como el tabaquismo, la presión diastólica y el colesterol⁵³. Los datos del HOPE (*Heart Outcomes Prevention Evaluation*), afirman que es un factor continuo de riesgo, incluso a partir de valores tan bajos como 0,5 mg/mmol. Cada incremento de 0,4 mg/mmol, supone un aumento del riesgo de sufrir algún tipo de episodio cardiovascular del 5,9 %⁵⁴, convirtiendo la albuminuria en un objetivo terapéutico prioritario.

El proceso fisiopatológico que explicaría la asociación de la ERC con el desarrollo de enfermedad cardiovascular es complejo⁵⁵. A medida que desciende el FGe, se alteran muchas funciones fisiológicas y reguladoras del riñón, apareciendo las múltiples complicaciones de la ERC, tales como, la anemia secundaria a un déficit de la síntesis de eritropoyetina o la alteración del metabolismo óseo mineral, que favorecen así la calcificación vascular.

El estudio realizado por Liu aporta evidencia sobre el papel de la microinflamación en los factores de riesgo cardiovascular tradicionales, como el colesterol en los pacientes con ERC⁵⁶. Dentro de los predictores de riesgo cardiovascular en pacientes con ERC, se han descrito la Proteína C reactiva (PCR), hipoalbuminemia, fibrinógeno, colesterol total (CT) como marcador de malnutrición⁵⁷, Interleucina (IL-6) y Factor VII, lipoproteínas (a) (Lp[a]) y apolipoproteína⁵⁸. Además, la alteración del metabolismo mineral óseo, como niveles de fósforo elevado⁵⁹, el producto calcio fósforo y los valores extremos de PTHi⁶⁰, también se han visto implicados. Algunos autores hablan sobre la homocisteína aunque todavía su papel es controversial⁶¹.

La anemia que presentan nuestros pacientes juega un rol importante, como lo describíamos previamente. Son múltiples los estudios que apoyan que la anemia, por si sola, es un factor de riesgo cardiovascular, condicionando un estado de microinflamación crónica²⁵. El solo hecho del déficit de eritropoyetina, puede ser un factor de riesgo cardiovascular al disminuir el número de células precursoras del endotelio⁶².

En el año 2003 Silverberg et al. propusieron una nueva entidad conocida como el Síndrome Cardio-Renal-Anemia, en la que estas tres condiciones forman un círculo vicioso. La anemia acelera la progresión de la ERC y aumenta la intensidad de la insuficiencia cardiaca, aumentando su mortalidad. La insuficiencia cardiaca acelera la

progresión de la anemia empeorando el pronóstico de la ERC. Por último, a medida que avanza la ERC, empeora la anemia y la clase funcional en la insuficiencia cardíaca⁶³.

Un factor tradicional pero muy poderoso es la HTA, tanto de enfermedad cardiovascular, como de afección renal, siendo la segunda causa de inicio de TSR. La retención de sodio y la activación del sistema renina angiotensina, se han considerado máximos factores de la elevación de la presión arterial⁶⁴.

El control de la HTA se basa en un abordaje individualizado, en el cual se incluyen medidas no farmacológicas, como dieta y cambios de estilo de vida y medidas farmacológicas. Dentro de las medidas farmacológicas, la elección del fármaco se basa en función de varios parámetros, como son la edad, enfermedades de base y comorbilidades asociadas. Los fármacos bloqueantes del sistema renina angiotensina, inhibidores de la enzima de conversión de la angiotensina (IECA) o antagonistas de los receptores de la angiotensina II (ARA II), constituyen la base del tratamiento antihipertensivo farmacológico tanto en pacientes no diabéticos, como en los diabéticos con cociente albúmina/creatinina ≥ 30 mg/g²¹. Este grupo de fármacos, aparte de proporcionar un adecuado control tensional, también es el grupo de elección para el control de la proteinuria, que como hemos comentado previamente, es un factor de riesgo cardiovascular por si sola.

1.7. Estrés Oxidativo, Inflamación y Disfunción Endotelial en la Enfermedad Renal Crónica

El estrés oxidativo es el estado de desequilibrio entre sustancias pro y antioxidantes, que está presente en múltiples patologías. La edad avanzada, la diabetes y la hipertensión, pueden predisponer a un mayor estrés oxidativo, en comparación con la población general. El hecho de que el estrés oxidativo aumente a medida que progresa la ERC⁶⁵ y la evidencia hasta ahora obtenida, nos apoya para afirmar que existe una asociación entre la uremia y que esta contribuye a un aumento del estrés oxidativo^{66,67}. Este aumento del estrés oxidativo no se normaliza con la hemodiálisis o la diálisis peritoneal, es más podría exacerbarla, objetivándose una reducción de los niveles de antioxidantes^{68,69}, razón por la cual es objeto de estudio cómo poder revertir este estado oxidativo.

Por todo ello, no es extraño que muchos planes de investigación se centren en identificar el papel que juegan estos mecanismos en la progresión de la ERC e identificar marcadores sensibles y robustos de riesgo, que puedan ser potencialmente modulables como objetivos de intervención terapéutica. Cada nuevo marcador y mecanismo de daño endotelial, y por tanto renal, debe ser probado en estudios en humanos primero, para establecer su correspondencia con situaciones clínicas. Si este vínculo queda establecido, deben hacerse pequeños estudios clínicos de prueba de concepto, que permitan seleccionar los mejores candidatos a ser marcadores de riesgo o dianas terapéuticas. Sobre esta base se desarrollarán futuros estudios de intervención clínica que, de ser exitosos, abrirán nuevas oportunidades a la nefroprotección, a pesar de ser un largo y con frecuencia ingrato camino de desarrollo.

En el organismo, la principal fuente reactiva de oxígeno es la cadena respiratoria mitocondrial, contribuyendo así a la senescencia celular⁷⁰. Existen otras fuentes celulares de especies reactivas del oxígeno (ROS) como diferentes enzimas celulares, la lipoxigenasa, la ciclooxygenasa, la mieloperoxidasa, la NADPH oxidasa (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa), la xantina oxidasa y en el caso de la L-arginina o el agotamiento de tetrahidrobiopterina, la óxido nítrico sintetasa⁷¹⁻⁷⁵. La producción de ROS se produce por la vía univalente de oxígeno molecular (O_2) dando lugar a tres formas reducidas incompletas: anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo (OH^{\cdot}). Mediante el sistema enzimático NADPH oxidasa se formará el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), altamente inestable, por lo que inmediatamente se convierte en peróxido de hidrógeno (H_2O_2). El anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) interactúa con el óxido nítrico (NO) para formar especies de nitrógeno altamente reactivas, mientras que el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) reacciona con el hierro intracelular para formar radicales hidroxilo (OH^{\cdot}), que están fuertemente implicados en la degradación de los lípidos de la membrana celular, la agregación de proteínas y el daño en el ácido desoxirribonucleico (ADN)^{70,76}. La medición *in vivo* de estos oxidantes no es posible, debido a que son compuestos altamente reactivos con una vida media de solo segundos. Por ello, utilizamos los lípidos, proteínas, carbohidratos y ácidos nucleicos, después de ser modificados por los radicales libres de oxígeno que tienen una vida media más larga, de hasta semanas, facilitando así su medición.

Los productos avanzados de oxidación proteica conocidos como AOPP por sus siglas en inglés, fueron aisladas por Witko-Sarsat et al. en paciente urémicos⁴⁶. Los AOPP están estrechamente relacionados con los marcadores de activación de monocitos. Estos pueden servir como mediadores de la inflamación y se correlacionan positivamente con

las concentraciones plasmáticas de ditrosina y productos finales de glicación avanzada (AGEs) como la pentosidina, que indican daño mediado por oxidante. La existencia de una fuerte relación entre AOPP y AGE condujo al concepto de estrés carbonílico, donde la oxidación actúa junto con la glicación en la formación de AGEs⁷⁷.

Sin embargo, la relación casual entre el estrés oxidativo y la enfermedad cardiovascular en la ERC aún no se ha establecido plenamente. Tal vez se debe a la falta de estudios adecuadamente diseñados⁷⁸ o por la dificultad añadida de analizar la población con ERC. Esto puede ser debido a que presentan de manera concomitante muchas patologías presentes en la población general como la HTA o la DM, las cuales también asocian un aumento del estrés oxidativo. Se ha postulado que el aumento del estrés oxidativo conduce a una reducción de la actividad biológica del NO⁷⁹. El NO es un importante modulador del endotelio vascular, sintetizado por el mismo y responsable de múltiples procesos locales. Entre ellos destacan vasodilatación, inhibición de adhesión y agregación plaquetaria, inhibición de la proliferación de las células musculares lisas vasculares y la interacción leucocito/endotelio, sin olvidar el papel como antioxidante⁸⁰. Por ello, es de esperarse que una disminución en su producción potenciará las lesiones ateroscleróticas.

Son varios estudios como los de Nguyen-Khoa⁸¹ y Mezzano et al⁸², que sugieren que el estrés oxidativo y la inflamación están vinculados en pacientes con enfermedad renal crónica avanzada. La inflamación es parte de la fisiopatología de la enfermedad renal, asociándose con los principales factores de riesgo de disfunción renal modificables. La respuesta inflamatoria juega un papel muy importante en la defensa del organismo frente a agresiones externas, pero si esta inflamación se perpetúa en el tiempo, como sucede en pacientes urémicos, este estado inflamatorio crónico pasa de ser un mecanismo de defensa, a ser un mecanismo de agresión⁸³. La inflamación crónica se produce cuando el agente causal no puede ser eliminado y genera una respuesta antigénica persistente. Las células que intervienen en esta inflamación crónica son los macrófagos, los linfocitos y las células plasmáticas⁸⁴. La ERC puede contribuir a la inflamación como resultado de la acumulación de componentes pro-inflamatorios o productos del catabolismo. Los productos finales de la glicación avanzada (AGEs) resultan de la reacción de la glucosa y otros carbohidratos con proteínas, específicamente con la lisina, vía glicosilación no enzimática y oxidación de proteínas. Los AGEs tienen capacidad para activar las células mononucleares y éstas inician directamente una respuesta inflamatoria⁸⁵. La inflamación, a su vez, participa en la producción de más AGEs, cerrando un círculo vicioso de daño endotelial⁸⁶.

El 60 % de las muertes de pacientes estables en HD son de causa cardiovascular, que está en relación directa con el proceso inflamatorio. Los pacientes con valores basales de proteína C reactiva (PCR) más elevados tuvieron un riesgo relativo 2,4 más alto de muerte y 1,7 de muerte cardiovascular ($p < 0,0001$). La PCR elevada fue el mayor predictor de mortalidad junto con la edad y la enfermedad cardiovascular previa⁸⁷. Toda esta evidencia, prueba la relevancia de la inflamación en la progresión del daño renal y el valor de la PCR como marcador básico, aunque no constituye un objetivo terapéutico en si mismo. Tanto la inflamación crónica como el aumento del estrés oxidativo y el acúmulo de las toxinas urémicas objetivado en la ERC, son responsables de la disfunción endotelial. A esto se le suma todos los factores de riesgo cardiovascular clásicos como la hipertensión arterial, la dislipidemia o el tabaco que también alteran la fisiopatología el endotelio.

La disfunción endotelial se define como un desequilibrio en la biodisponibilidad de sustancias activas de origen endotelial que predispone a la inflamación, la vasoconstricción y el incremento de la permeabilidad vascular, siendo considerado un percusor de aterosclerosis⁸⁸, agregación plaquetaria y trombosis. Pannier y cols. han demostrado que existe una relación entre vasodilatación dependiente del endotelio y los parámetros de remodelado cardiovascular en pacientes urémicos, sugiriendo que la disfunción endotelial estaría implicada en el remodelado cardiovascular (arteriosclerosis, hipertrofia ventricular izquierda) urémico⁸⁹. Durante la inflamación hay una interacción de los leucocitos con el endotelio vascular que se desencadena siguiendo varias etapas. El proceso implica al rodamiento leucocitario mediado por selectinas, la adhesión leve mediada por las moléculas de adhesión VCAM-1 (Molécula de adhesión de la célula vascular-1) e ICAM-1 (Molécula de adhesión intercelular-1) y la firme adhesión posterior mediada por las quimiocinas (en especial la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1)) y la IL 8⁹⁰.

Las moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1 y E-selectina) se expresan durante la aterogénesis⁹¹ y se ha descrito un aumento en la concentración de estas, en los pacientes con ERC⁹². Todas estas moléculas inflamatorias forman parte del complejo mecanismo de daño endotelial, que está detrás del proceso de progresión de la ERC y que necesitamos desentrañar con cada nuevo elemento de investigación.

1.8. Marcadores de Daño Endotelial

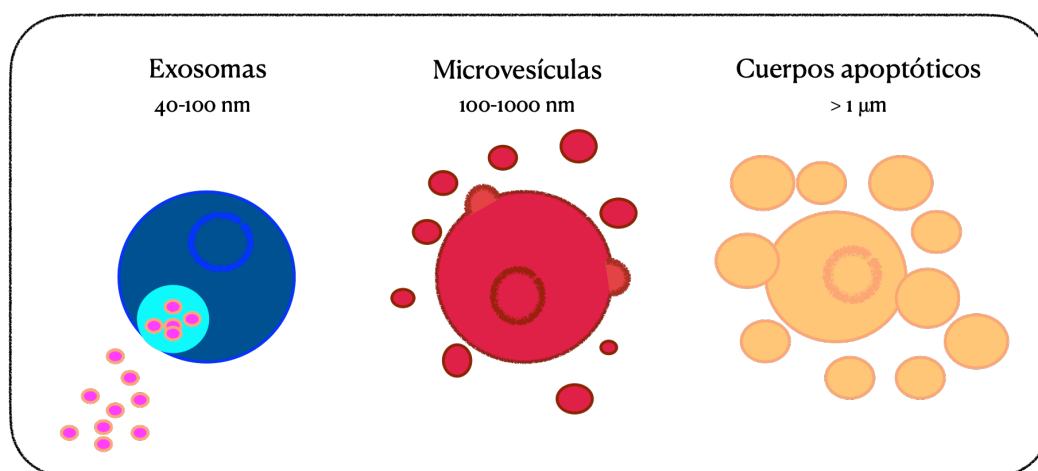
Dentro de los marcadores de inflamación relacionados con el daño vascular más estudiados, se encuentra la Proteína C reactiva (PCR). Es una proteína plasmática circulante que se produce en el hígado, como respuesta a las citoquinas, específicamente al factor de necrosis tumoral alfa (TNF - α) y IL - 1 β . Se trata de una respuesta inespecífica y se eleva en cualquier proceso inflamatorio, dificultando así muchas veces su interpretación en procesos específicos. Autores previos han descrito que la proteína C reactiva induce liberación de microvesículas endoteliales a través de la formación de óxido nítrico dependiente de tetrahidrobiopterina (BH4)⁹³. Como comentábamos previamente, se ha relacionado un aumento de la PCR con la mortalidad cardiovascular⁹⁴, pero al ser tan inespecífica muchas veces es un factor de confusión. En los últimos años, se han propuestos nuevos biomarcadores para estudiar el estado del endotelio y su funcionamiento como las microvesículas.

1.8.1. Vesículas extracelulares

Todas las células eucariotas pueden liberar diferentes tipos de vesículas de extracelulares, conocidas como microvesículas (MV), exosomas y cuerpos apoptóticos. Estas se diferencian entre sí por su tamaño, su contenido y los mecanismos de formación. En la *Figura 2* podemos observar los diferentes mecanismos de formación de las vesículas extracelulares. Todas ellas forman parte de un complejo sistema de señalización y comunicación intercelular⁹⁵.

Los exosomas son las formaciones de menor tamaño (30 - 100 nm), se producen por endocitosis y su contenido corresponde al existente en el compartimento endosomal, por lo que su membrana presenta poco o nada de fosfatidilserina (PS) y expresan específicamente marcadores como la proteína 1 de membrana asociada a lisosomas (Lamp1), CD63, gen 101 de susceptibilidad tumoral (TSG101) y además contienen ácido ribonucleico (RNA) y microRNA⁹⁶.

Figura 2. Proceso de liberación y formación de vesículas extracelulares.



Las células del organismo pueden liberar tres tipos de vesículas extracelulares como podemos observar en la figura: Exosomas, microvesículas y cuerpos apoptóticos, que se diferencian entre sí por su tamaño, composición bioquímica y mecanismo por el cual han sido liberados.

Los cuerpos apoptóticos tienen un tamaño entre 1 – 5 µm, generándose en los últimos pasos de la muerte celular programada. Son más grandes que las microvesículas o los exosomas y se caracterizan por presentar una membrana permeable que externaliza PS, por lo que facilita la tinción con ioduro de propidio del material nuclear que contienen⁹⁷.

Las microvesículas tienen un tamaño entre 0,1 – 1 µm, exteriorizan PS y albergan un subconjunto de lípidos de membrana celular y proteínas derivadas de sus células parenterales. En los últimos años, las microvesículas derivadas del endotelio, se han descrito como un marcador precoz de disfunción endotelial. En la *Tabla 2* podemos observar las diferentes características de las distintas vesículas extracelulares y como se diferencian según su tamaño composición y propiedades de membrana.

Tabla 2. Características de los distintos tipos de vesículas extracelulares.

Características de los distintos tipos de vesículas extracelulares			
	Exosomas	Microvesículas	Cuerpos apoptóticos
Tamaño	40 - 100 nm	100 - 1000 nm	> 1 μ m
Mecanismo de formación	Fusión de cuerpos multivesiculares con membrana plasmática.	Evaginaciones de la membrana plasmática	Contracción y muerte celular
Características	LAMP1 CD63 TSG101	Anexina V+ Marcadores de superficie específicos celulares	Anexina V+ DNA
Contenido	Proteínas RNA microRNA	Proteínas RNA microRNA	Proteínas ADN Organelas celulares RNA microRNA.
Propiedades de membrana	Rica en lípidos Impermeable.	Exteriorizan fosfatidilserina Rica en lípidos Impermeable.	Exteriorizan fosfatidilserina Permeable

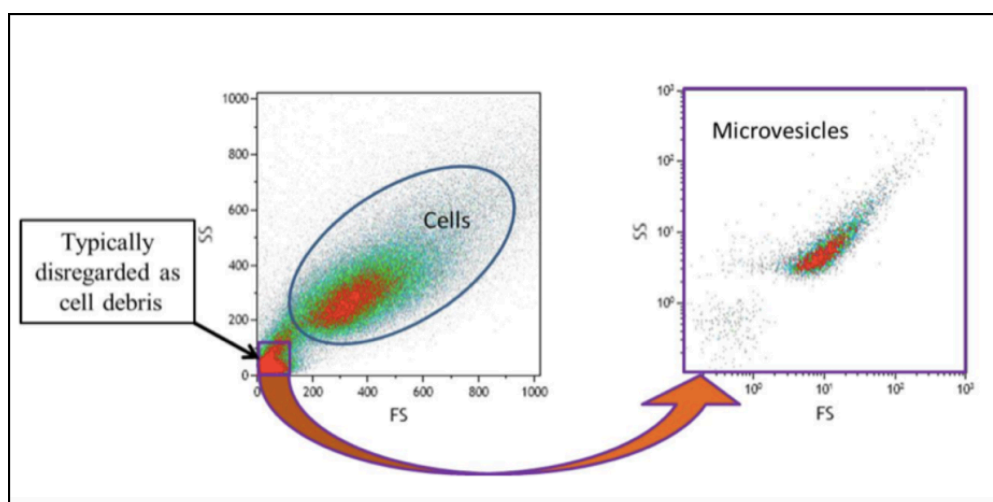
LAMP1: proteína 1 de membrana asociada a lisosomas; TSG101: gen 101 de susceptibilidad tumoral. DNA: ácido desoxirribonucleico. RNA: ácido ribonucleico. Nota: Imagen adaptada de la tabla *Microparticles: biomarkers and beyond*, 2013.

1.8.2. Microvesículas

Las microvesículas fueron descritas por primera vez por Wolf, en el año 1967, como fragmentos de la membrana plaquetaria “dust” (*Figura 3*) en el plasma del ser humano⁹⁸. En la actualidad, las microvesículas se definen como evaginaciones de menos de 1 μ m de diámetro, que se liberan de las membranas plasmáticas de los diferentes tipos de células, en respuesta a diferentes procesos como la activación, lesión o apoptosis⁹⁹. Por lo tanto, pueden estar presentes tanto en procesos fisiológicos como fisiopatológicos.

Las microvesículas se han llegado a detectar en sangre, orina, líquido sinovial y muchos otros fluidos de pacientes con distintas patologías¹⁰⁰. Desde su descubrimiento han sido foco de estudio dado que actúan como una *network* de comunicación entre célula y célula, debido a que albergan componentes de sus células parentales¹⁰¹.

Figura 3. Representación de las microvesículas como “dust” polvo celular.



La tecnología nos ha permitido observar más allá de las líneas celulares, antiguamente las microvesículas eran conocidas por polvo celular. Imagen tomada de internet escrito por Tim Bushnell, PhD

1.8.3. Formación de las Microvesículas

En la literatura se describen dos procesos que conllevan a la formación de microvesículas que son: la activación celular y la apoptosis. En la activación celular, la liberación de microvesículas se produce como respuesta a un estímulo, que incrementan la concentración del calcio citosólico, activando las quinasas y la calpaina e inhibiendo las fosfatasas¹⁰². La formación de microvesículas por apoptosis dependen de la activación de la Rho-quinasa (ROCK-1), que interviene en la contracción de la miosina de la membrana celular, posibilitando la unión de la proteína Rho al guanósín trifosfato (GTP)¹⁰³. La apoptosis se caracteriza por contracción celular, fragmentación del DNA y la formación dinámica de membranas, razón por la cual, estas microvesículas llevaran consigo resto de DNA fragmentado¹⁰⁴. En la actualidad, es todavía desconocido si la activación celular y la apoptosis conducen a la formación de micropartículas similares en términos de tamaño, composición de lípidos, proteínas y efectos fisiológicos y fisiopatológicos¹⁰².

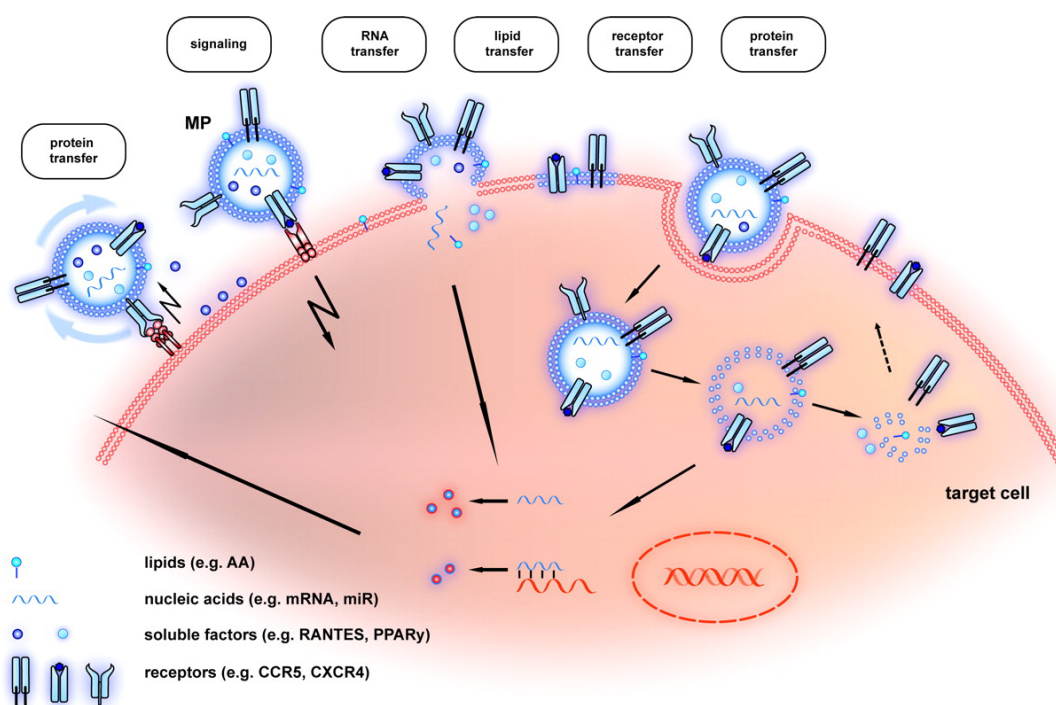
1.8.4. Composición de las Microvesículas

Las microvesículas están formadas principalmente por lípidos y proteínas. Gran parte de la composición de las microvesículas dependerá de su célula parenteral y de la

forma en la que se originó. Su composición proteica nos dará pistas de la célula original, usando anticuerpos directos contra epítopos específicos y estará formada por una capa de lípidos oxidados y varios fosfolípidos¹⁰⁵.

Las microvesículas expresan en su superficie abundantes sustancias bioactivas, receptores anclados a la membrana y moléculas de adhesión, permitiendo un amplio abanico de interacciones con múltiples células diana. También son el transporte de citocinas, quimiocinas, enzimas, factores de crecimiento, proteínas de señalización¹⁰⁶ y de RNA mensajero (mRNA) y microARN, en ciertos tipo de microvesículas¹⁰⁷. En la *Figura 4* se representan los diferentes componentes moleculares y vías utilizadas por las microvesículas para la transferencia intercelular de información. Las microvesículas liberan mediadores solubles que pueden actuar directamente sobre la célula diana o inducir liberación de otras moléculas, así mismo transferir además componentes de membrana.

Figura 4. Diferentes vías utilizadas por las microvesículas para la transferencia intercelular de información.



Diferentes mecanismos por los cuales las microvesículas (MP) transfieren información a la célula diana, como mediadores solubles, transportando componente de membrana, receptores y ácidos nucleicos. Nota: Imagen tomada del artículo de Mause SF et al. *Microparticles: Protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. Circulation Research.* 2010; 107: 1047-1057.

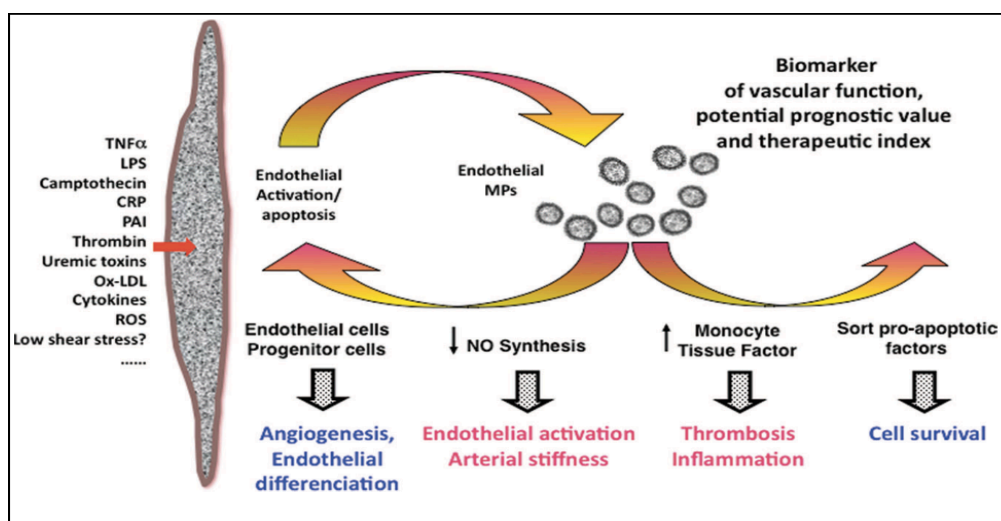
1.8.5. Microvesículas Endoteliales

Las microvesículas endoteliales (MVEs) son aquellas microvesículas liberadas del endotelio. Se han descrito múltiples estímulos responsables para su liberación, como el factor de necrosis tumoral¹⁰⁸ y las citoquinas inflamatorias. *In vitro*, han sido capaces de inducir la liberación de MVEs los lipopolisacáridos bacterianos, ROS¹⁰⁹, inhibidor del activador del plasminogeno¹¹⁰, trombina¹¹¹, PCR⁹³ y toxinas urémicas¹¹². Razón por la cual, han generado un gran interés de estudio en múltiples patologías.

En la actualidad, se desconoce cual es el mecanismo preciso *in vivo* que regula la formación y la liberación de las mismas. Como podemos observar en la *Figura 5*, las MVEs pueden tener efectos nocivos como la activación del endotelio, trombosis e inflamación y paradójicamente efectos beneficiosos como supervivencia celular y angiogenesis⁹⁵.

Respecto a su composición, las MVEs dependerán del estímulo que las haya generado. Específicamente en su interior, transportan proteínas endoteliales como la L-cadherina endotelial vascular, molécula de adhesión de células endoteliales plaquetarias-1, ICAM-1, endoglina, E-selectina, α_v integrina¹¹³. Por otro lado, pueden transportar ácidos nucleicos (DNA and RNA) incluidos mRNAs, microRNAs, RNA pequeño de interferencia (siRNAs) y ARN largos no codificantes (lncRNAs)^{114–116}.

Figura 5. Representación de los diferentes estímulos conocidos por aumentar la liberación de MVEs en cultivos celulares y sus funciones biológicas paradójicas.



En color azul se representan los efectos beneficiosos a nivel endotelial y en color rojo los efectos nocivos. ROS: Reactive Oxygen Species. MP: Microvesículas. Figura tomada de Dignat-George, F et al. *The many faces of endothelial microparticles. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011; 31: 27-33.

También se ha identificado en las MVE, el óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y el receptor del factor de crecimiento vascular endotelial vascular (VEGF-R2)¹¹⁷. El primero no se ha demostrado que pueda inducir o producir liberación de NO y no es específico de las MVEs, encontrándose en las MV liberadas por plaquetas. Respecto al VEGF-R2 se desconoce cual es su función.

La E-selectina y VE-cadherina (cadherina del endotelio vascular) son proteínas que expresan específicamente las MVEs⁹⁵. Como se mencionaba previamente las microvesículas, en general expresan proteínas propias de la célula parental, facilitando su reconocimiento mediante citometría de flujo. La peculiaridad de las microvesículas liberadas del endotelio, es la falta de especificidad de esas proteínas haciendo compleja su cuantificación.

1.8.6. Microvesículas endoteliales como biomarcadores y mediadores de daño vascular

En determinadas situaciones fisiológicas, las MVEs colaboran en el mantenimiento de la homeostasis vascular, participando en el metabolismo del entorno vascular. Estas actúan sobre la pared vascular en las células del músculo liso, regulando la reactividad vasomotora como la angiogénesis¹¹⁸. Por ello, parece una teoría plausible que la formación y la eliminación de las MVEs, reflejen un estado de equilibrio entre la activación y el daño celular.

Las MVEs desempeñan un papel importante en la inflamación, la trombosis, la angiogénesis y la disfunción endotelial¹¹⁹. Son múltiples los estudios que sugieren la asociación de niveles elevados de MVEs en sangre a mayor riesgo cardiovascular¹²⁰⁻¹²². En la ERC también se han sido descritas como posibles marcadores de daño endotelial¹²³, pero muchas veces con resultados contradictorios.

Los experimentos *in vitro* sugieren que las MVEs modulan el tono vascular actuando sobre el NO y la prostaciclina¹²⁴, promoviendo así el estrés oxidativo. Este efecto pueden producirlo al inhibir irreversiblemente la activación de NO sintetasa (NOS) y disminuyendo la biodisponibilidad de NO a nivel celular. También tienen capacidad para regular la producción de ROS¹²⁵, aunque existen ciertas discrepancias con respecto a los sistemas de generación de ROS afectados. Estas discrepancias en los resultados pueden deberse a la cantidad y calidad de las microvesículas estudiadas.

Una característica importante de las MVEs es que contienen la enzima NADPH oxidasa (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidasa)¹²⁶ que aumenta la nitración de proteínas en las células endoteliales, intensificando así el estrés oxidativo¹²⁷. Las MVEs producen cantidades significativas de aniones superóxido y radicales libres mediante la fosforilación dependiente de las quinasas PI3K/ERK. El grupo de Brodsky et al.¹²⁴ observó como las MVEs causan relajación de la pared vascular en ratas, debido a la producción de aniones superóxido y a la reducción de la biodisponibilidad de óxido nítrico.

Las MVEs promueven la coagulación, efecto favorecido por su carga negativa debido a la presencia de fosfolípidos en particular PS¹²⁸. Además, generan trombina a través del factor VII y el FT¹²⁹ y mediante la unión de plaquetas activadas a través del receptor de selectina P.

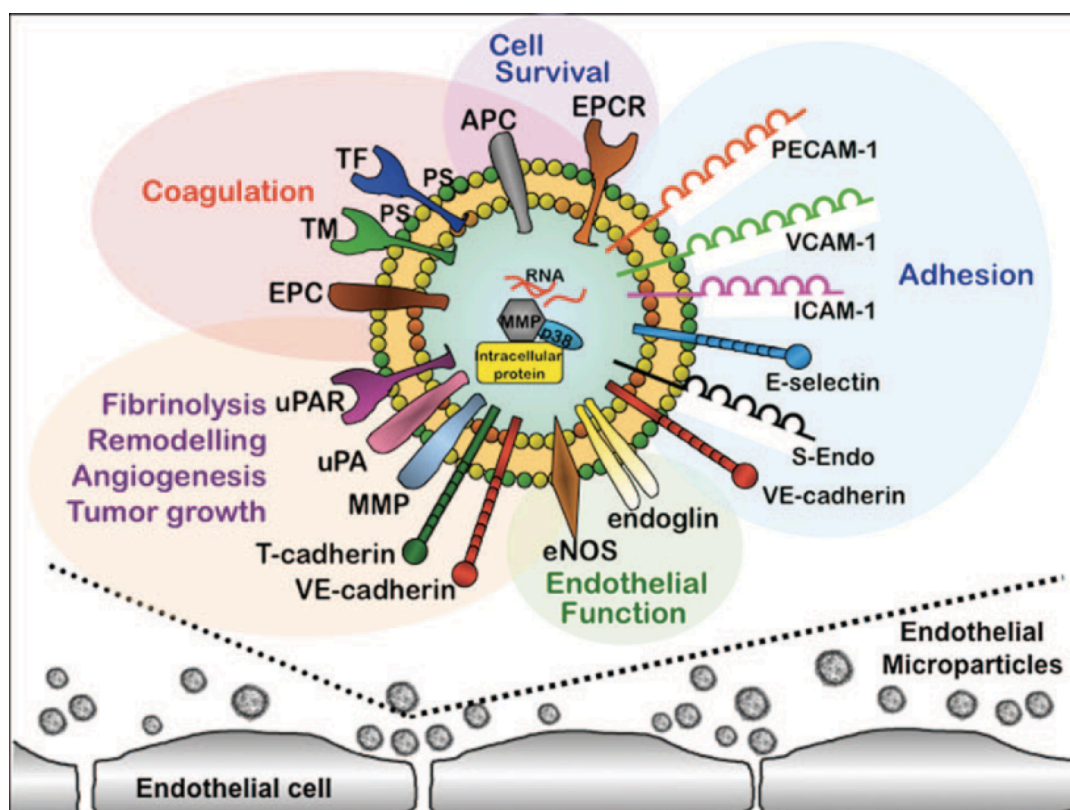
Las MVEs parecen ser tanto una consecuencia como causantes de la inflamación. Aumentan la expresión de las moléculas de adhesión en las células endoteliales y facilitan la interacción con los monocitos¹³⁰. Se ha demostrado que la administración de MVEs en ratas, aumenta los valores sistémicos y alveolares de citoquinas proinflamatorias como la Interleuquina -1 β and TNF- α , con infiltración neutrofílica en el espacio perivascular^{131,132}.

Como se mencionaba previamente, la apoptosis es un mecanismo de formación de las MVEs, pero adicionalmente se cree que podría ser también una consecuencia de la señalización de las microvesículas. Dentro de la composición de las MVEs podemos encontrar la proteína caspasa 3 (CASP3)¹³³, que no son específicas de las MVEs dado que han sido aisladas en microvesículas derivadas de monocitos, eritrocitos y plaquetas. La proteína CASP3 es un miembro de la familia de la cisteína-ácido aspártico proteasa (caspasa), que desempeña un papel central en la apoptosis celular. Se ha sugerido que las MVEs liberarían la CASP3 en las células diana, participando en la inducción de apoptosis¹³⁴.

Aunque las MVEs, como hemos expuesto previamente, son proinflamatorias, procoagulantes e inhiben la reparación vascular¹¹⁹, es importante tener en cuenta que podrían también tener efectos favorables sobre la homeostasis vascular. Esto último va a depender del contexto patológico y los mecanismos que han llevado a su formación, indicándonos la complejidad de las mismas, no solamente en su composición sino en los mecanismos que conllevan a su formación. Estamos comenzando a comprender el papel de las MVEs en el daño cardiovascular y parte de los resultados aparentemente

contradictorios pueden deberse a una excesiva simplificación del modelo fisiopatológico. No sólo importa cuantas MVEs midamos, sino su contenido y posiblemente su secuencia temporal e interacción. En la *Figura 6* se muestran las moléculas transportadas por las MVEs y sus diferentes efectos a nivel de la célula endotelial.

Figura 6. Representación de las múltiples moléculas transportadas por la MVEs y sus efectos biológicos asociados.



EPCR receptor de la proteína C endotelial; PECAM-1, molécula de adhesión de células endoteliales de plaquetas¹; VCAM-1, molécula de adhesión vascular 1; ICAM-1: moléculas de adhesión intercelular 1; E-selectin: selectina endotelial; S-Endo: CD146/molécula de adhesión de células de melanoma; VE-cadherin: cadherina del endotelio vascular; eNOS, óxido nítrico sintetasa endotelial; MMP: metaloproteinasas de matriz; uPA: activador del plasminógeno tipo uroquinasa; uPAR: Receptor de activador del plasminógeno tipo uroquinasa; EPC: proteína C endotelial; TM: trombomodulina. Figura tomada de Dignat-George, Françoise Boulanger, Chantal M. *The many faces of endothelial microparticles. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. 2011; 31: 27-33.

1.8.7. Microvesículas endoteliales y Enfermedad Renal Crónica

Son múltiples las patologías que pueden elevar las MVEs, entre ellas está descrita la ERC. Son varios los estudios que han demostrado que toxinas urémicas como los fosfatos, p-cresol, p-cresyl sulfato, indoxyl sulfato y la homocisteína son capaces de estimular la liberación de microvesículas¹³⁵⁻¹³⁷, pudiendo así justificar su implicación en la elevada mortalidad cardiovascular de este grupo de pacientes. Amabile et al.¹²³ describieron la asociación entre el aumento de MVEs en la ERC y su asociación con disfunción endotelial. En su trabajo objetivan como las MVEs se correlacionaron altamente con la pérdida de la dilatación mediada por flujo, el aumento de la velocidad de la onda del pulso aórtico y del índice de aumento de la arteria carótida común. Igualmente, demostraron *in vitro* que las MVEs liberadas de pacientes con ERC disminuían la liberación de NO, mientras que las MVEs aisladas de sujetos sanos no. Asimismo, el grupo de Faure et al.¹¹² demostraron que las MVEs estaban elevadas en pacientes con ERC y en hemodiálisis respecto a población sana. Por otro lado, un reciente estudio de Carmona et al, describe como esta elevación va a determinar la mortalidad de causa cardiovascular¹³⁸.

Toda la evidencia acumulada hasta el momento acerca de las MVEs, nos refuerza el pensar que tienen un papel protagónico en la progresión de enfermedades cardiovasculares, reflejando el grado de activación o apoptosis de las células endoteliales, por lo que podrían ser un importante biomarcador precoz de daño celular. El hecho de que participen tan activamente en todos estos procesos ya sean fisiológicos como fisiopatológicos, comportándose como una *network* de comunicación, capaces de transferir información biológica a otras células, aumenta aún más su interés como posibles dianas terapéuticas. Por ello, en la actualidad existe un gran interés en las modificaciones que se producen sobre las MVEs en respuesta a un tratamiento farmacológico.

Debido a la falta de consenso sobre el método más adecuado para aislar de la MVEs y a la complejidad de su comportamiento *in vivo*, muchas veces hay resultados contradictorios. Por ejemplo el grupo de Green et al¹³⁹ observaron una variabilidad, tanto en la línea de base como en los cambios longitudinales en la MVEs, a pesar de seleccionar pacientes con enfermedad renal aparentemente estable, lo que dificulta la interpretación de su resultado.

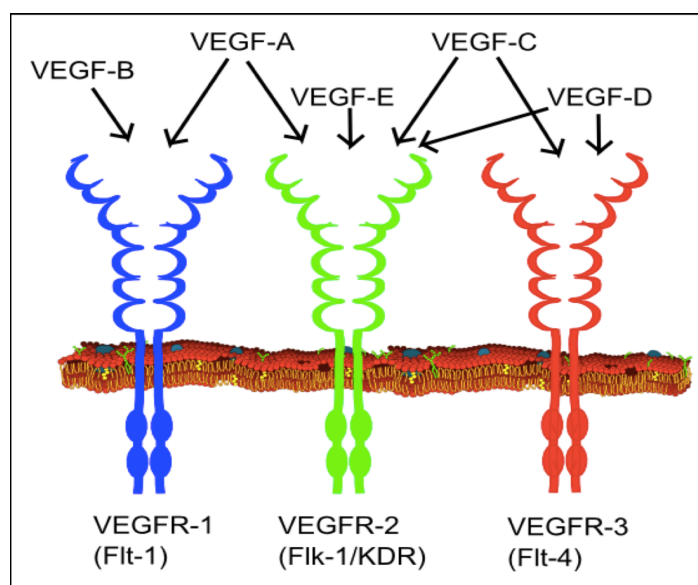
En este trabajo quisimos objetivar la relación del estrés oxidativo y la cantidad de MVEs en pacientes con ERC, así como las modificaciones que sufren estos biomarcadores con el tratamiento farmacológico, muchos de ellos específicos para nuestros pacientes, con el objetivo de encontrar posibles dianas terapéuticas. Se trata de aportar nuevos elementos que permitan caracterizar su papel en el mundo clínico real de la ERC.

1.8.8. Microvesículas endoteliales y factores crecimiento endotelial

Los factores de crecimiento están estrechamente relacionados con los procesos de aterosclerosis y angiogénesis. En los últimos años, ha sido de gran interés el VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular), tanto como marcador de daño endotelial, como una posible diana terapéutica.

El VEGF fue descubierto en los años 80 al inicio conocido como factor de permeabilidad vascular. Actualmente, conocemos que es una familia conformada por 7 subtipos: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F, and PlGF (factor de crecimiento placentario). El VEGF tiene alta afinidad a tres receptores específicos (*Figura 7*) de actividad tirosina cinasa (RTKs) VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3. Estos receptores se pueden encontrar, tanto de manera soluble en la circulación, como en la superficies de las células endoteliales y células derivadas de la médula ósea^{140,141}.

Figura 7. Imagen que representan los tipos de VEGF y sus receptores.



NOTA: Imagen tomada de tomada Häggström, Mikael (2014). "Medical gallery of Mikael Häggström 2014.

El VEGF A es una glicoproteína de 34-42 kDa, que en condiciones normales se puede encontrar elevado en riñón, pulmón, corazón y glándulas suprarrenales¹⁴². Sabemos que este factor de crecimiento está involucrado en múltiples funciones biológicas a nivel de la célula endotelial, donde es el responsable de estimular la mitosis y migración celular, así como de promover la angiogénesis en los procesos de inflamación crónica¹⁴²⁻¹⁴⁴. Adicionalmente incrementa la permeabilidad vascular mediado por óxido nítrico, pero también ha sido descrita su acción sobre los monocitos induciendo su activación y migración, añadiéndole a esta citoquina un papel en procesos inflamatorios y de reparación de herida¹⁴⁵.

La regulación de la liberación de este factor de crecimiento puede ser debida a múltiples estímulos descritos en la *Tabla 3*, como son la hipoxia, los productos avanzados de glicosilación, las interleuquinas, los radicales libres de O₂ y muchos más.

Tabla 3. Estímulos de liberación del VEGF.

Producción autocrina/paracrina de VEGF:
Hipoxia.
Productos avanzados de glicosilación (AGEs).
Interleuquina 1 y 6 (Il-1, IL-6).
Factor de crecimiento similar a la insulina (IGF).
Factor de crecimiento epitelial (EGF).
Factor de crecimiento tisular b (TGF-b).
Radicales libres de O ₂ .
Adenomas.
Metales de transición.

NOTA: Tabla modificada de Caramelo C, Castilla MA, González-Pacheco FR, Martin O, Arroyo MVA. Papel del factor de crecimiento vascular (VEGF) en la respuesta proliferativa endotelial. *Nefrología*. 1998;18(SUPPL. 1):112-114.

Como sabemos, el riñón es una fuente importante del VEGF y también objetivo de acción del mismo, sobre todo a nivel de las células tubulares epiteliales y los podocitos. Se ha descrito que los niveles de VEGF están alterados en procesos como el fracaso renal agudo, ERC, la nefropatía diabética y el síndrome metabólico entre otros, promoviendo así disfunción microvascular y alteraciones morfológicas a nivel del endotelio.

Partiendo de la hipótesis de que la elevación de los niveles de VEGF se relaciona con lesiones de aterosclerosis en arterias coronarias y que son pro-aterogénicas^{146,147}, son varios los grupos que han centrado sus esfuerzos en modificar la expresión del VEGF como una posible diana terapéutica.

No hemos encontrados estudios que analicen la relación del VEGF con las microvesículas endoteliales en la enfermedad renal. Aunque, si sabemos que las microvesículas plaquetarias y las derivadas de células madres mesenquimales pueden inducir angiogénesis *in vitro* mediado por VEGF^{148,135} y las MVEs expresan VEGFR-2.

A lo largo de esta introducción, hemos constatado que la ERC tiene una elevada prevalencia, suponiendo un elevado impacto personal, sanitario y de coste. A pesar de ser potencialmente reversible está infradiagnosticada y los mecanismos de progresión son muy complejos. En la actualidad disponemos de herramientas para la detección precoz de ERC y para la nefroprotección, que han resultado eficaces en ensayos clínicos como el control de HTA, obesidad, proteinuria, etc. Por todo ello, la ERC es un problema clínico relevante y constituye un escenario fisiopatológico muy indicado para profundizar en el conocimiento de los mecanismos de progresión del daño.

También hemos revisado las evidencias de que el endotelio es el vínculo vasculo-renal. Estamos empezando a entender, cómo se comunican estos órganos y cómo esta relación podría incluir elementos de riesgo, marcadores y hasta mediadores que resulten ser objetivos terapéuticos en el futuro. La inflamación es un elemento constitutivo del daño cardiovascular y renal, existiendo múltiples evidencias en investigación básica de que su modulación protege la progresión del daño renal. Sin embargo, han fracasado todos los ensayos clínicos.

Finalmente, las microvesículas forman parte de este sistema de comunicación endotelial y han mostrado jugar un papel relevante en enfermedades cardiovasculares y en el envejecimiento. Queremos estudiar el papel de las MVEs en la enfermedad renal crónica y contribuir a aclarar el complejo mapa de interacciones en el proceso renal y la aparente contradicción de los modelos *in vitro* llevando este estudio al entorno clínico real.

Hipótesis

La enfermedad renal crónica asocia una elevada morbilidad de origen cardiovascular como consecuencia tanto por la presencia de factores de riesgo comunes como por el estado proinflamatorio propio de la uremia que generaría una cascada de eventos que condiciona este estado de fragilidad.

En los últimos años ha aumentado el interés, en la búsqueda de nuevos biomarcadores que nos puedan ayudar a caracterizar de manera precoz a los pacientes con mayor riesgo. Las microvesículas endoteliales (MVEs) se han identificado como un importante biomarcador en patología cardiológica, aumentando el interés por saber cuales son sus mecanismos de formación y su función a nivel celular, así como conocer su comportamiento en relación a otros marcadores involucrados en la disfunción endotelial.

En la enfermedad renal crónica, las MVEs pueden ser un marcador precoz de daño y actuar como una red de comunicación intercelular, al expresar y llevar en su interior diferentes tipos de proteínas y material genético, activando otros biomarcadores. Por tanto, es de interés saber cual es su comportamiento en los diferentes estadios de enfermedad renal crónica, incluyendo el estadio 5D, una vez que hemos resuelto el estado de uremia máximo. Igualmente, objetivar si se altera por las diferentes patologías que acompañan de manera habitual a nuestros pacientes, así como valorar si los diferentes tratamientos médicos tienen alguna repercusión en su número y composición.

Objetivos

Este proyecto nace como parte de una línea de investigación traslacional, mediante la colaboración de una Unidad de investigación básica reconocida, como la del departamento de Biología de sistemas de la Universidad de Alcalá y dos Servicios de Nefrología, de los Hospitales Universitarios Puerta de Hierro Majadahonda e Infanta Leonor, con gran experiencia en la investigación clínica. Nuestro objetivo principal es caracterizar biomarcadores tempranos y potenciales dianas terapéuticas en la enfermedad cardiovascular, que es tan prevalente en los enfermos renales.

Como se comenta previamente, la enfermedad cardiovascular continúa siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con enfermedad renal crónica. Las microvesículas endoteliales han surgido como un novedoso sistema de comunicación intercelular, que pueden actuar como mecanismo fisiopatológico en la enfermedad cardiovascular al transmitir señales anómalas a las células diana. Por tanto, su determinación y modulación se han convertido en herramientas de ayuda al diagnóstico y potencial diana terapéutica.

El objetivo general del proyecto es investigar el potencial de estas microvesículas circulantes en plasma como biomarcadores y potenciales dianas terapéuticas, en la enfermedad cardiovascular, que habitualmente presentan los pacientes con enfermedad renal crónica.

Para ello nuestros objetivos operacionales serán:

- Describir la presencia y características de las microvesículas endoteliales en las diferentes etapas de la enfermedad renal crónica.
- Analizar su asociación con otros biomarcadores presentes en la disfunción endotelial y con parámetros analíticos utilizados en la práctica clínica habitual.
- Analizar la repercusión de los fármacos habituales prescritos en enfermedad renal crónica sobre estos biomarcadores.
- Evaluar si la corrección de la uremia con diálisis tiene un efecto sobre las microvesículas endoteliales.
- Analizar *in vitro* el efecto de las microvesículas de pacientes con Nefropatía diabética sobre cultivos celulares endoteliales.

Material y métodos

4.1. Tipo de estudio

Se trata de un estudio observacional y transversal, con determinaciones *in vitro* e *in vivo*.

El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos (CEIm) del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda (Certificado No. 304, noviembre 10, 2014) y a todos los participantes se les proporcionó el consentimiento informado por escrito previo a su inclusión. (ANEXO 1: aprobación del CEIm).

El estudio se engloba dentro de las líneas de investigación de la red pública de investigación renal REDInREN RD12 / 0021 / 0019 y RD16 / 009 / 009 cofinanciada por dos proyectos competitivos FIS Instituto de Salud Carlos III; Expedientes: PI 14 / 00806 (2015 - 2017) y FIS PI 19 / 00240 (2020 - 2022). ANEXO 2 y 3 respectivamente.

Se ha contado con la participación del Biobanco del Instituto Investigación Sanitaria Puerta de Hierro - Segovia de Arana que realiza la gestión de muestras y su conservación, protección de datos y archivo de los consentimientos informados (ANEXO 4: consentimiento informado).

4.2. Estudio *in vivo*

4.2.1. Muestra de los pacientes

Se seleccionaron pacientes, durante el periodo comprendido entre 2014-2015, de la consulta externa de Nefrología y Unidades de diálisis de dos hospitales de la comunidad de Madrid (Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda y Hospital Universitario Infanta Leonor), que fueron luego comparados con un grupo control compuesto por personas voluntarias sin patología asociada.

4.2.2. Criterios de inclusión y exclusión

Los criterios de inclusión para el grupo control:

- Ser mayor de 18 años.
- No tener enfermedad renal conocida.

- Sexo masculino.
- Firmar el consentimiento informado.
- No tener otras comorbilidades asociadas conocidas.

Los criterios de inclusión para el grupo ERC no dependiente de diálisis fueron:

- Ser mayor de 18 años.
- Estar diagnosticado de ERC no dependiente de diálisis.
- Firmar el consentimiento informado.

Los criterios de inclusión para el grupo de Hemodiálisis fueron:

- Ser mayor de 18 años.
- Firmar el consentimiento informado.
- Estar al menos 3 meses incluido de programa de Hemodiálisis crónicos y con una pauta de al menos 3 sesiones a la semana.

Los criterios de exclusión para el grupo conformado por pacientes ERC no dependiente de diálisis y el grupo hemodiálisis fueron:

- Síndrome de apnea obstructiva del sueño.
- Procesos inflamatorio activo de cualquier origen en los últimos 3 meses.
- Procesos tumorales malignos diagnosticados en los últimos 5 años.
- Tratamiento inmunosupresor en el momento de la inclusión.

4.2.3. Variables clínicas

Los datos demográficos, de etiología renal, comorbilidad, factores de riesgo cardiovascular, así como de laboratorio estándar y tratamiento farmacológico se recogieron a partir de las historias clínicas electrónicas departamental (Nefrolink®) y hospitalaria (Selene®).

Se diseñó una base de datos específica en Access para la recogida de todos los datos clínicos y analíticos en conjunción con los datos de investigación básica. La base de datos se alojaba en los servidores del Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, cumpliendo los requisitos de la Agencia Española de Protección de Datos, conforme a Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Las variables incluidas son:

- **Demográficas:**
 - Edad, sexo, grupo étnico.
- **Enfermedad renal:**
 - Etiología de enfermedad renal.
 - Filtrado glomerular estimado (FGe) por CKD-EPI, estadio de enfermedad renal crónica, proteinuria medida por cociente proteinuria en orina / creatinina en orina).
- **Comorbilidad asociada:**
 - Diabetes.
 - Hipertensión arterial.
 - Eventos cardiovasculares previos.
 - Enfermedad cerebrovascular previa.
 - Enfermedad arterial periférica.
- **Factores de riesgo cardiovascular:**
 - Fumador / Exfumador.
 - Bebedor / No bebedor.
 - Índice de masa corporal (IMC).
- **Tratamiento farmacológico**

- **Tratamiento sustitutivo renal (en su caso):**
 - Tipo de técnica: HD Convencional, HD alta eficacia, Hemodiafiltración (HDF) on-line.
 - Pauta: Tiempo, filtro y peso seco.
 - Tipo de acceso vascular: Fístula arteriovenosa nativa, Fístula arteriovenosa protésica, catéter central tunelizado.
 - Eficacia medida mediante Kt.
- **Parámetros de laboratorio:**
 - Hemograma (Hemoglobina, leucocitos y fórmula leucocitaria, plaquetas).
 - Bioquímica (perfil férrico, óseo mineral, lipídico, hepático).
 - Marcadores de inflamación como PCR, ferritina, albúmina.

4.2.4. Obtención de las muestras sanguíneas

En los pacientes del grupo ERC no diálisis se extrajeron muestras de sangre con una aguja de calibre 21G después de aplicar un torniquete ligero.

Para los pacientes en programa de hemodiálisis crónica, los valores se tomaron inmediatamente antes del inicio de la sesión de diálisis del día intermedio.

Los Parámetros de investigación básica analizados fueron:

- Niveles de MVEs.
- Niveles de VEGF.
- Niveles de AOPP.

Además, se sacaron muestra para realizar hemograma, bioquímica completa y análisis de orina.

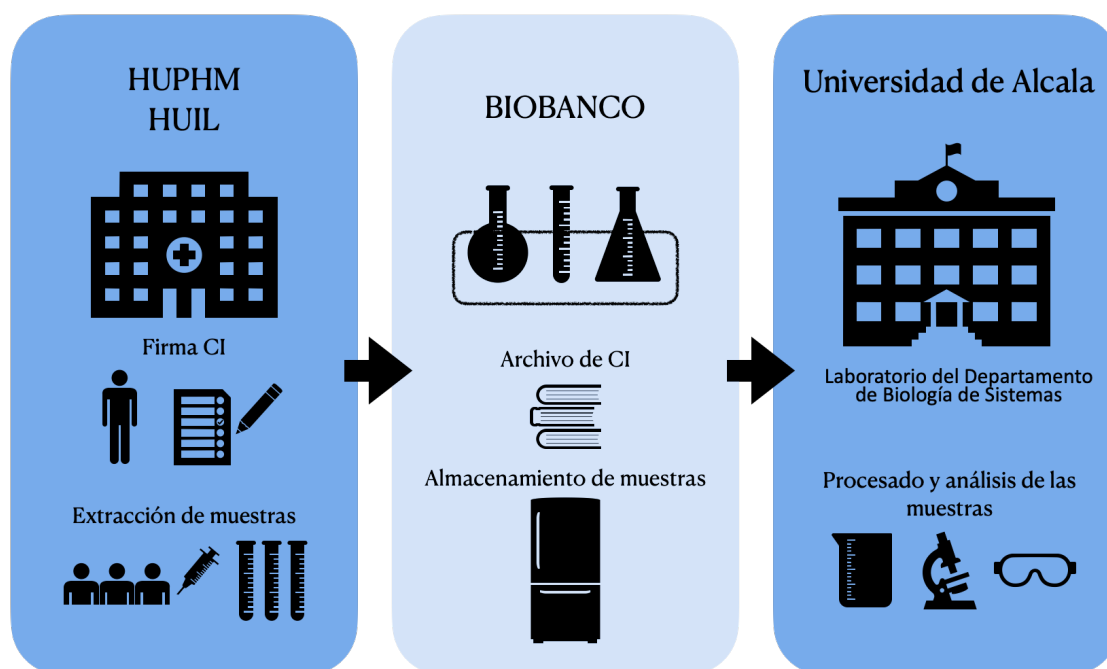
4.2.5. Gestión de muestras y métodos realizados

Las analíticas sanguíneas se realizaron los laboratorios de los respectivos hospitales (Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda y Hospital Universitario Infanta Leonor).

El almacenamiento de muestras hasta el traslado al laboratorio del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá, se realizó en el Biobanco del Instituto Investigación Sanitaria Puerta de Hierro - Segovia de Arana.

Los análisis de investigación básica se realizaron en el Laboratorio del Departamento de Biología de Sistemas de la Universidad de Alcalá de Henares. En la *Figura 8* podemos observar el esquema de este circuito, desde la recolección de muestras hasta su análisis.

Figura 8. Esquema del circuito de recolección de muestras, almacenamiento y procesado.



HUPHM: Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda; HUIL: Hospital Universitario Infanta Leonor; CI: consentimiento informado.

4.2.5.1. Recolección de sangre, aislamiento y análisis por citometría de flujo de microvesículas endoteliales

Se extrajeron muestras de sangre con una aguja de calibre 21 G con un torniquete ligero. Se descartaron los primeros 4 ml y se recogió la sangre en tubos VACUETTE® que contiene EDTA. Si el paciente pertenecía a un grupo en Hemodiálisis las muestras eran obtenidas de la línea arterial del acceso vascular. Las muestras prediálisis eran obtenidas inmediatamente previo al inicio de la sesión y las muestras post-diálisis se las obtenían reduciendo el flujo sanguíneo (Qb) a 50 ml / min al final de la sesión.

Veinte minutos después de la recogida se centrifugó el plasma a 1500 g, sin freno, durante 20 minutos a temperatura ambiente. El plasma se centrifugó adicionalmente durante 2 minutos a 13.000 g para obtener plasma pobre en plaquetas. Se recogieron alícuotas de plasma de 1,5 ml y se congelaron inmediatamente a -80°C hasta su uso.

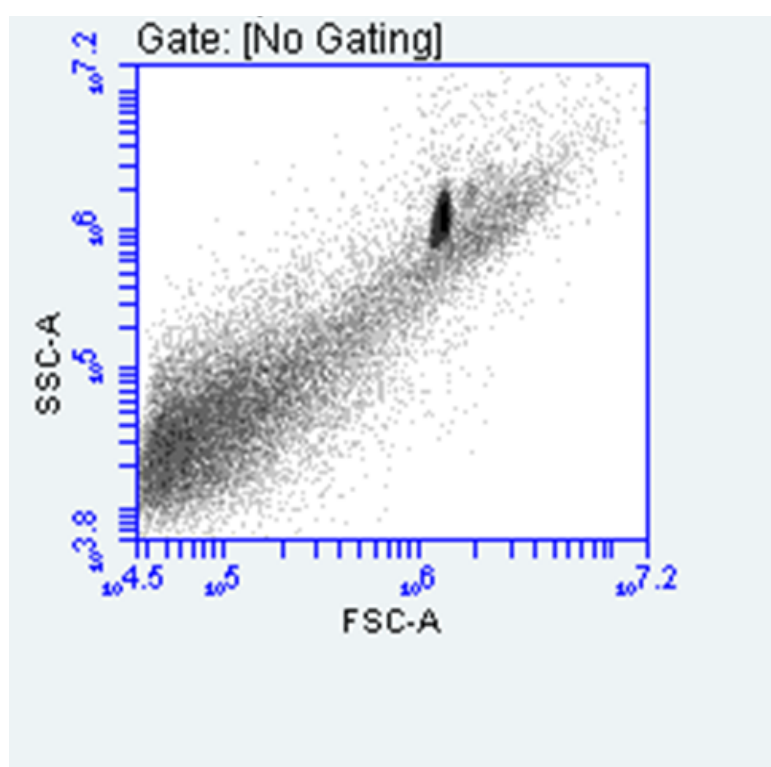
La caracterización de los MVEs se realizó como se ha descrito previamente en otros estudios¹⁵⁰ utilizando citometría de flujo (Beckman Coulter Cytomic FC 500, CoulterInc, Fullerton, California, EE.UU.) con el software CXP (Beckman Coulter). El portal se ajustó con el diagrama de detector de dispersión lateral vs detector de dispersión frontal y se consideraron como microvesículas aquellos eventos con un tamaño entre 0,5 - 1,5 μm . Para ello se utilizaron perlas de calibración fluorescentes con tamaños que varían desde 0,1 - 1,9 μm (SPHERO™ Flow Cytometry Nano Fluorescent Size Standard Kit, Spherotech, Lake Forest, IL USA). Se excluyeron los eventos menores de 0,2 μm y mayores de 1,9 μm y así evitar cuerpos apoptóticos.

Para la caracterización de las MVEs plasmáticas se realizó un etiquetado triple fluorescente. Se incubaron 100 ml de plasma pobre en plaquetas con anticuerpo anti - CD31 monoclonal marcado con isotiocianato de fluoresceína (BD Pharmingen, San Diego, California, EE.UU.), anticuerpo monoclonal anti - CD42b (Abcam, Cambridge, MA) de Peridinin Chlorophyll Protein Complex, y kits de ficoeritrina - anexina V (BD Pharmingen, San Diego, California, EE.UU.) en tampón de unión de anexina V (HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM) siguiendo las instrucciones del fabricante del kit de anexina.

Para identificar las microvesículas unidas a anticuerpos monoclonales específicos de células, las microvesículas fueron incubadas con concentraciones idénticas de anticuerpos de control isotópico para establecer el umbral.

Solo se definieron como eventos CD31 + / CD42b - / anexina V +, debido a que las microvesículas derivadas de células endoteliales y de plaquetas expresan CD31 pero solo estas últimas también manifiestan CD42b. El número absoluto de MVEs por microlitro se cuantificó según tamaño usando el citómetro de flujo Beckman Coulter Cytomic FC 500 con el software CXP. Los datos son la media de 3 medidas independientes de la misma muestra. En la *Figura 9* se muestra un ejemplo de resultados de citometría de flujo.

Figura 9. Dot plot (diagrama de puntos) obtenido por Citometría de Flujo de Microvesículas.



Se añaden perlas de calibración (azul). En rojo observamos los recuentos totales de microvesículas sobrenadantes. SSC- A : detector de dispersión lateral; FSC-A: detector de Dispersión Frontal)

4.2.5.2. Productos avanzados de oxidación proteica y Factor de crecimiento endotelial vascular

La concentración plasmática de AOPP se midió en muestras de plasma recogidos en tubos con etilendiaminotetraacético (EDTA) y se mantuvieron congeladas a - 80°C. La

concentración de AOPP se midió mediante ELISA utilizando el kit comercial CSB-E09925h, (CUSABIO BIOTECH. LTD). Este ensayo emplea la técnica cuantitativa de inmunoensayo enzimático (Tipo *sandwich*). Los ensayos se realizaron por duplicados.

- Se añade 100 µl de la muestra a cada pocillo y se deja en incubación a 37 °C durante 2 horas. Retiramos el líquido de cada pocillo sin lavar.
- Añadimos 100 µl de anticuerpo- biotina en cada pocillo, incubamos durante 1 hora a 37 °C. Posteriormente aspiramos y lavamos en 3 ocasiones.
- Añadimos 100 µl de HRP-avidin (sustratos de peroxidasa de rábano picante), avidina en español) a cada pocillo e incubamos durante una hora a 37 °C. Aspiramos y lavamos 5 veces.
- Añadimos 90 µl de sustrato de 5,5'-tetrametilbencidina (TMB) a cada pocillo incubamos durante 20 minutos a 37 °C protegiendo de la luz.
- Añadimos 50 µl de la solución Stop y leemos a 450 nm en un lector de ELISA dentro de 5 minutos.

Los niveles de VEGF se analizaron en suero mediante ELISA utilizando el kit Quantikine VEGF ELISA (R & D Systems, Minneapolis, MN). Los ensayos se realizaron por duplicados.

- Añadimos 100 µl de diluyente de ensayo a cada pocillo. Añadimos 100 µl del suero a cada pocillo. Cubrimos con una tapa para placas e incubamos a temperatura ambiente durante 2 horas.
- Aspiramos cada pocillo y lavamos, repitiendo el proceso en 3 ocasiones. Añadimos 200 µl del conjugado a cada pocillo y cubrimos con una tapa para placas e incubamos a temperatura ambiente durante 2 horas. Aspiramos y lavamos 3 veces.
- Añadimos 200 µl de la solución sustrato a cada pocillo e incubamos por 25 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Añadimos 50 µl de la solución *STOP* e incubamos por 25 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.

4.3. Estudio *In Vitro*

Realizamos un estudio *in vitro* para reforzar los resultados encontrados en los estudios *in vivo*, utilizando pool de plasma de pacientes catalogados de ERC asociado a la diabetes en diferentes estadios de enfermedad renal, siguiendo los criterios de inclusión y de exclusión previamente mencionados. Se selecciono los siguientes grupos:

- Plasma de pacientes con ERC en estadio 4 (n: 5).
- Plasma de pacientes en diálisis peritoneal (n: 5).
- Plasma de pacientes previo a la sesión de hemodiálisis (n: 5).
- Plasma de pacientes posterior a la sesión de hemodiálisis (n: 5).

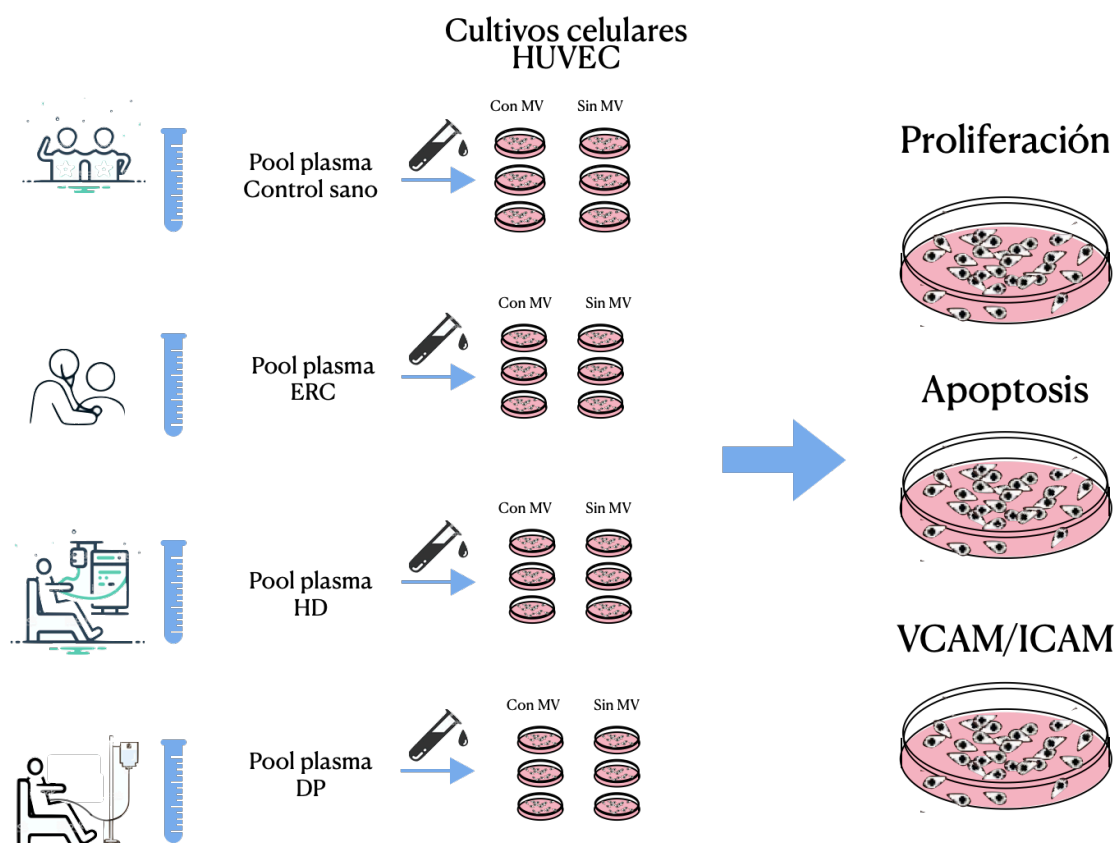
Por cada grupo se obtuvo un pool de plasma con microvesículas y se conformo otro pool libre de estas. El procedimiento de aislamiento microvesículas del plasma se comenta en el apartado 4.3.2. Como grupo control se utilizo un pool obtenido de voluntarios sanos. Para realizar los cultivos se utilizó, como modelo de endotelio humano, la línea celular endotelial de la vena umbilical humana (HUVEC) con plasma completo o con aislamiento de las microvesículas como podemos observar en la *Figura 10*. Los parámetros analizados fueron:

- Porcentaje de proliferación celular.
- Porcentaje de apoptosis.
- Expresión de ICAM y VCAM.

4.3.2. Aislamiento de Microvesículas del plasma

Se realizó el aislamiento de microvesículas a partir de plasma de pacientes, en diferentes estadios de enfermedad renal: ERC no diálisis, diálisis peritoneal, hemodiálisis pre y posterior a la sesión. Se recogió las muestras de sangre periférica en tubos VACUETTE® que contienen EDTA. Las condiciones de centrifugación fueron 4 °C 15 minutos, 14000 rpm. El sobrenadante se conservó como plasma libre de microvesículas.

Figura 10. Esquema del estudio realizado in vitro en pacientes con nefropatía diabética.



HUVEC: human umbilical vein endothelial cells; MV: microvesículas; ERC: enfermedad renal crónica; HD: hemodiálisis; DP: diálisis peritoneal; VCAM: molécula de adhesión vascular; ICAM: molécula de adhesión intercelular.

4.3.3. Pool de Microvesículas

Se realizó un pool tanto con las microvesículas obtenidas de pacientes con ERC, DP, hemodiálisis pre y posterior a la sesión, como de sus respectivos sobrenadantes libres de estas.

4.3.4. Cultivos Celulares

Para realizar los cultivos se utilizó, como modelo de endotelio humano, la línea celular HUVEC (ATCC category number PCS – 100 - 010) que se cultiva a 37 °C, 5 % de CO₂ en medio endotelial estándar basal (EeBM, CAMBREX BioScience, Walkersville,

EE.UU.), junto con los suplementos de crecimiento celular (EGM, Cambrex) y 10 % de suero bovino fetal (FBS, Invitrogen - Molecular Probes, Eugene OR, EE.UU.).

Se sembraron en placas de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 cel/ml y se incubaron durante 24 horas, con el 20 % de los distintos pools de plasmas con y sin microvesículas, utilizando como control el 20 % de suero de pacientes sin ERC. Todas las condiciones se hicieron por triplicado y se realizaron 3 experimentos.

4.3.5. Proliferación Celular

Para determinar el porcentaje de proliferación con los distintos tratamientos se utilizó el kit de Becton Dickinson Pharmingen Technical FITC Mouse Anti-Human PCNA. El antígeno nuclear de células en proliferación, PCNA por sus siglas en inglés es una proteína nuclear sintetizada en la fase G1 temprana y en la fase S del ciclo celular. El PCNA es casi indetectable en otras fases del ciclo lo cual lo hace un excelente marcador de proliferación celular.

Realizamos el experimento siguiendo las instrucciones del fabricante:

1.- Usando un vórtex, agregamos 5 ml de etanol frío al 70 % - 80 % gota a gota en el sedimento celular. Posteriormente incubamos a -20°C durante al menos 2 horas.

2.- Se lava en dos ocasiones con tampón de tinción 30 - 40 ml y centrifugamos durante 10 minutos a 200 g. y se resuspenden las células a una concentración de 1×10^7 /ml.

3.- Transferimos 100 μl (1×10^6 células) de suspensión celular a cada tubo de muestra y agregamos 20 μl de anticuerpo anti-PCNA y se mezcla suavemente.

4.- Incubamos los tubos a temperatura ambiente durante 20-30 minutos en la oscuridad. Luego lavamos con 2 ml de la solución tampón para tinción a 200 g durante 5 minutos y aspiramos el sobrenadante.

5.- Se agrega 0.5 ml de tampón para tinción a cada tubo y 10 μl de yoduro de propidio y se procede al análisis mediante citometría de flujo.

4.3.6. Apoptosis

El porcentaje de apoptosis se midió realizando un doble marcaje con anexina V conjugada con FITC (isotiocianato de fluoresceína) y tinción con ioduro de propidio (IP) de células HUVECs, tratadas 24 horas con un 20 % de plasma de cada condición de los distintos pools a estudio utilizando el kit de detección de Becton Dickinson. Se utilizó el citómetro de flujo FACSCalibur de Becton Dickinson y el software Cyflogic para análisis.

La anexina V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio que tiene una alta afinidad por la fosfatidilserina (PS). Durante la apoptosis, ocurre una pérdida de la asimetría de la membrana y externalización de la fosfatidilserina, siendo esto una de los eventos más precoces. La anexina V conjugada con el fluorocromo FITC se usa para determinar cuantitativamente el porcentaje de células que están experimentando apoptosis activamente.

Otra característica, de las membranas plasmáticas de las células vivas, es que rechazan los colorantes catiónicos cargados como el ioduro de propidio (IP), por lo que este tipo de colorante es solo captado por células que se encuentren en un estado avanzado de apoptosis¹⁵¹. Las células con tinción positiva para anexina V FITC y negativa para IP están experimentando apoptosis temprana. Las células, que se tiñen positivamente tanto para anexina V FITC como para IP, están experimentando apoptosis tardía o están sufriendo necrosis.

El experimento se realizó siguiendo las recomendaciones del fabricante:

1.- Se lavan las células dos veces con tampón fosfato salino (PBS) frío y luego se resuspenden las células en solución reguladora de unión a una concentración de 1×10^6 células/ml.

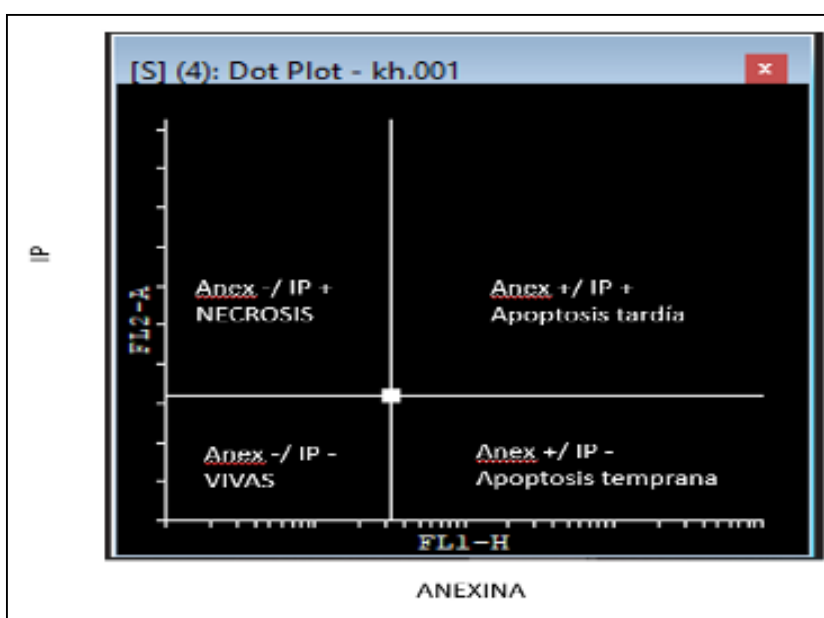
2. Transferimos 100 μ l de la solución a un tubo de cultivo de 5 ml.

3. Añadimos 5 μ l de anexina V conjugada con FITC y 5 μ l de IP y se agita suavemente las células usando un agitador vórtex, posteriormente incubamos durante 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

4.- Para finalizar agregamos 400 μ l de solución reguladora de unión a cada tubo y se analiza por citometría de flujo una vez transcurrida una 1 hora.

Todas las condiciones se hicieron por triplicado y se realizaron 3 experimentos. Para el análisis de los datos adquiridos, se utilizaron poblaciones de células que fueron positivas tanto para la anexina V como para la IP, considerándolas en estado de apoptosis tardía. Finalmente, analizamos las diferencias, en porcentajes, obtenidas en las condiciones experimentales (Figura 11).

Figura 11. Imagen de Dot plot obtenido por citometría de flujo para valorar la apoptosis.



FL1 representa a señal de yoduro de propidio y FL2 representa la señal anexina. Se consideran doble positivos las imágenes que aparecerán en el cuadrante superior derecho. FL: fluorescencia; Anex: anexina; IP: yoduro de propidio.

4.3.7. Expresión de la molécula de adhesión intercelular y la molécula de adhesión de la célula vascular

La expresión de VCAM-1 e ICAM-1 se midió a partir de células HUVECs tratadas 24 horas con un 20% de plasma de cada condición de los distintos pools a estudio. El grupo control son células tratadas con un pool de suero AB de sujetos sin ERC.

Después de la exposición, se obtuvieron HUVECs por ruptura mecánica y se lavaron una vez con tampón fosfato salino (PBS) 1x. A continuación, se utilizaron 10 µL de VCAM-1 (Anticuerpo monoclonal CD106 conjugado en PE, eBioscience™, Invitrogen) y 10 µL de ICAM-1 (Anticuerpo monoclonal CD4 conjugado FITC, eBioscience™,

Invitrogen) para evaluar la expresión en las diferentes condiciones experimentales. Se incubaron las HUVEC durante 20 minutos en la oscuridad. A continuación, las células se lavaron con tampón fosfato salino (PBS) 1x y se fijaron con BD CellFIX™ (Becton Dickinson, 340181 [Becton Dickinson Bioscience, San José, CA, EE. UU.]). Finalmente, se procedió a la adquisición de datos en el citómetro, con HUVEC sin el etiquetado de anticuerpos como referencia (como control negativo). Realizamos el experimento por triplicado. Para el análisis de los datos adquiridos en el citómetro, utilizamos la intensidad media de la fluorescencia (MFI) de diferentes anticuerpos (VCAM-1-PE e ICAM-1-FITC).

4.4. Análisis Estadístico

Los resultados se expresan como número y porcentaje para las variables cualitativas y para la distribución de grupos. Las variables cuantitativas se muestran como mediana y rango o rango intercuartílico (RIC), excepto donde se indique lo contrario.

Debido al tamaño muestral y a la imposibilidad de asegurar que las variables sigan una distribución normal, no se emplearon medias ni error estándar en la descripción de las mismas, sino test de contraste de hipótesis para muestras no paramétricas.

Las diferencias entre los grupos cualitativos se evaluaron por chi cuadrado o test exacto de Fisher, en el caso de ser que fuese necesario realizar alguna corrección por ceros. Entre variables cuantitativas, se empleó el test no paramétrico de Kruskal Wallis, test de los rangos con corrección de Bonferroni o ANOVA; los análisis post-hoc se realizaron con test de Tukey. La significación estadística de la correlación lineal entre variables se realizó con el test de Spearman.

Se realizó un análisis de regresión lineal para determinar si el nivel de MVEs está determinado por los fármacos concomitantes, ajustado por variables de confusión seleccionadas según el fármaco elegido, indicando el valor β y su correspondiente intervalo de confianza (IC) al 95 %. Las diferencias se consideraron significativas cuando los valores de p fueron igual o inferiores a 0,05.

Todos los análisis se realizaron con Stata (StataCorp 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX EE.UU.: StataCorp LP).

Resultados

Este proyecto se trata de un estudio transversal, con el objetivo de determinar el papel que juegan las microvesículas endoteliales (MVEs) como mediadores endoteliales en los diferentes estadios de enfermedad renal crónica (ERC) y qué factores intervienen en su regulación. Se incluyen en el estudio pacientes con ERC estadios 2-5, no dependientes de diálisis y pacientes en programa de Hemodiálisis (HD) que reciben distintos tratamientos farmacológicos.

Este apartado de Resultados se organiza según la siguiente estructura:

- Determinación de los niveles de MVEs en pacientes con ERC no dependientes de diálisis, en comparación con el grupo control.
- Estudio de la influencia de los diferentes estadios de ERC en los niveles de MVEs circulantes.
- Relación entre las MVEs y otros parámetros analíticos y biomarcadores asociados a la disfunción endotelial.
- Repercusión de los medicamentos habitualmente utilizados en ERC y riesgo cardiovascular sobre las MVEs y otros marcadores de función endotelial.
- Efecto que produce la hemodiálisis sobre los niveles de MVEs circulantes.
- Modelos *in vitro* de cultivos celulares con células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC) y su modulación por plasma de pacientes con ERC en presencia o ausencia de microvesículas.

5.1. Niveles de Microvesículas endoteliales en la Enfermedad renal crónica como marcador precoz de inflamación y daño endotelial

Se decide comenzar este estudio transversal en la población con ERC no dependiente de diálisis, con el propósito de valorar los cambios en los niveles séricos de la MVEs, respecto a un grupo control de población con función renal normal. Esto se debe a que todavía no se han definido los valores de referencia para las MVEs y por tanto, no podemos establecer que niveles séricos de MVEs se consideran patológicos. Como se ha descrito previamente en el apartado de métodos, hemos seleccionado los pacientes para conseguir una muestra lo más homogénea posible y con escasa o nula comorbilidad inflamatoria activa más allá de la propia ERC.

5.1.1. Características basales de la población estudiada

El grupo control, contra el que se comparará el grupo ERC no dependiente de diálisis estaba conformado por 8 voluntarios sanos, todos varones, sin patologías previas en edades comprendidas entre 18 y 65 años.

El grupo ERC no dependiente de diálisis eran 41 pacientes seguidos en la consulta externa de Nefrología en condiciones estables. La mediana de edad de la población estudiada fue de 51,5 años con un rango intercuartílico de [42,4 - 72,5] siendo el 73,2 % (n 30) varones. Un 39,1 % de los pacientes eran diabéticos, 75,6 % hipertensos y 9,8 % presentaban antecedente de cardiopatía isquémica. Un 48,8 % presenta hiperuricemia y un 48,8 % dislipemia.

Respecto a la etiología, la causa más frecuente de ERC de la población estudiada fue la nefropatía diabética con un 39 %, seguida por otras causas: no filiada 19,0 %, enfermedad poliquística 14,6 %, enfermedad glomerular 14,6 % y vascular 12,2 %.

La mediana del filtrado glomerular estimado (FGe) mediante la ecuación CKD-EPI (*Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration*) fue de 31,9 ml / min / 1,73 m², RIC [22 - 43,7], con un 48,8 % de pacientes con un FGe < 30 ml / min / 1,73 m². Las características basales se muestran a continuación en la *Tabla 4*.

Respecto al tratamiento farmacológico, la mayoría de los pacientes recibían IECA y/o ARA II (78 %), estatinas (46,3 %) y antiagregantes plaquetarios (26,8 %) como se puede observar en la *Tabla 5*.

TABLA 4. Características basales de la población a estudio en ERC no dependiente de diálisis.

<i>Características basales</i>	<i>n 41</i>
Hombres (%)	73,2
Edad (Mediana [RIC])	51,5 [42,4 - 72,5]
Edad >50 años (%)	53,7
Hipertensión arterial (%)	75,6
Diabetes mellitus (%)	39,0
Hiperuricemia (%)	48,8
Dislipemia (%)	48,8
Insuficiencia cardiaca (%)	19,5
Arteriopatía periférica (%)	9,8
Enfermedad cerebro vascular (%)	19,5
Cardiopatía isquémica (%)	9,8
FGe CKD-EPI ml/min/1,73 m ² (Mediana [RIC])	31,9 [22 - 43,7]
<30 ml/min/1,73 m ² (%)	48,8
31-44 ml/min/1,73 m ² (%)	26,8
45-59 ml/min/1,73 m ² (%)	14,6
>60 ml/min/1,73 m ² (%)	9,8
Colesterol total mg/dl (Mediana [RIC])	173,0 [149,0 - 196,0]
Colesterol total >200 mg/dl (%)	19,5
Triglicéridos mg/dl (Mediana [RIC])	110,5 [80,8 - 155,3]
Urea mg/dl (Mediana [RIC])	83,0 [58,0 - 111,0]
Ferritina ng/ml (Mediana [RIC])	128,5 [70,3 - 178]
IST % (Mediana [RIC])	20,0 [7,0 - 28,0]
PTHi pg/ml (Mediana [RIC])	147,5 [83,3 - 238,5]
Fósforo mg/dl (Mediana [RIC])	3,5 [3,2 - 4,1]
Hemoglobina g/dl (Mediana [RIC])	13,3 [12,3 - 14,7]
Leucocitos /uL (Mediana [RIC])	6955,0 [5585,0 - 7997,5]
Linfocitos /uL (Mediana [RIC])	1895,0 [1372,5 - 2235,0]
Albúmina g/dl (Mediana [RIC])	4,3 [4,1 - 4,5]
Proteínas totales g/dl (Mediana [RIC])	7,0 [6,7 - 7,4]
Acido úrico mg/dl (Mediana [RIC])	6,8 [6,4 - 8,6]
Sodio mmol/L (Mediana [RIC])	141,0 [139,0 - 143,0]
Potasio mmol/L (Mediana [RIC])	4,8 [4,4 - 5,2]
Lactato deshidrogenasa U/L (Mediana [RIC])	343,5 [288,5 - 385,5]
Hemoglobina glicosilada % (Mediana [RIC])	6,5 [5,6 - 7,8]
Pro/Cro mg/g (Mediana [RIC])	128,2 [23,4 - 451,3]

FGe: Filtrado glomerular estimado por CKD-EPI ml/min/1,73 m²; IST: Índice de saturación de transferrina; PTHi: hormona paratiroidea intacta; Pro/Cro: cociente proteínas/creatinina en orina; RIC: rango intercuartílico.

TABLA 5. Prescripción de los distintos fármacos de la muestra de estudio con ERC no dependiente de diálisis.

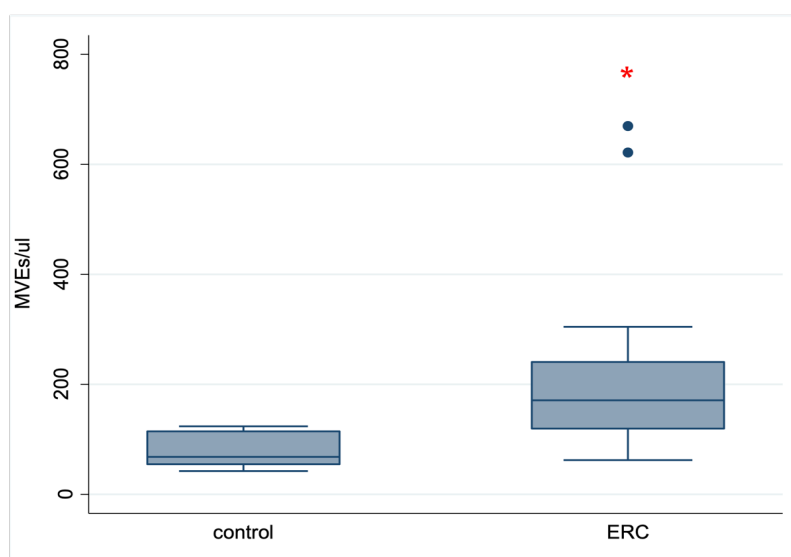
Fármacos	n 41
IECA /ARA II (%)	78,0
Bloqueadores de canales de calcio (%)	43,9
Antidiabéticos orales (%)	26,8
Insulina (%)	26,8
AEEs(%)	4,9
Hipouricemiantes (%)	36,6
Diuréticos de asa (%)	29,3
Tiacidas (%)	21,9
Estatinas (%)	46,3
Antiagregantes Plaquetarios (%)	26,8

IECA: inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARA II: antagonistas de los receptores de angiotensina II; AEEs: agentes estimuladores de eritropoyetina.

5.1.2. Niveles de Microvesículas endoteliales en la Enfermedad renal crónica

Encontramos un aumento en los niveles de MVEs circulantes en los pacientes con ERC no dependiente de diálisis en comparación con el grupo control (171 MVEs/ μ l [119,5 - 241] vs 68,5 MVEs/ μ l [55 - 115], $p < 0,001$), (Figura 12).

Figura 12. Niveles de MVEs en la Enfermedad renal crónica no dependiente de diálisis.



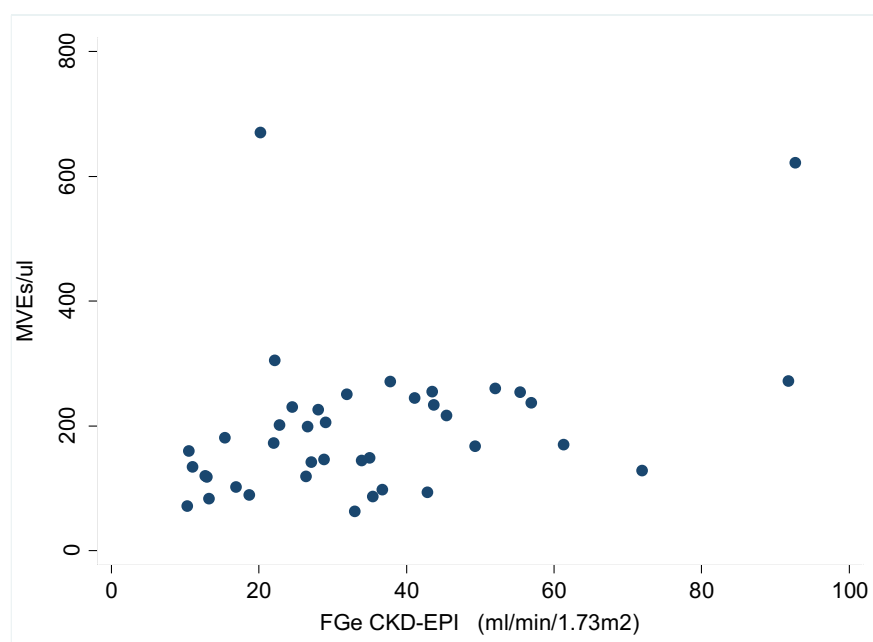
Los outliers se representan con puntos, * $p < 0,001$. MVEs: microvesículas endoteliales; ERC: enfermedad renal crónica.

Por lo tanto, se objetiva con estos resultados que los pacientes con ERC tienen niveles séricos elevados de MVEs respecto a los controles. El siguiente paso fue comprobar si el efecto de la ERC sobre las MVEs es progresivo, a lo largo del continuo de la ERC o existe un umbral a partir del cual hay un salto en los niveles de MVE. Para ello, analizamos la relación entre estadios de enfermedad renal crónica y MVEs, además de estudiar como pueden afectar las diferentes comorbilidades frecuentemente asociadas.

5.1.3. Microvesículas endoteliales y su relación con el grado de Enfermedad Renal Crónica

No objetivamos ninguna correlación entre el filtrado glomerular y la cantidad de MVEs circulantes, ni siquiera al separar por terciles según su FGe, como se refleja en la *Figura 13*. Por lo tanto, no podemos demostrar una relación lineal entre la elevación de las MVEs y la pérdida del FGe.

Figura 13. Relación entre los niveles de MVEs y el estadio de ERC no dependiente de diálisis.



FGe CKD-EPI: filtrado glomerular estimado por Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration; MVEs: microvesículas endoteliales.

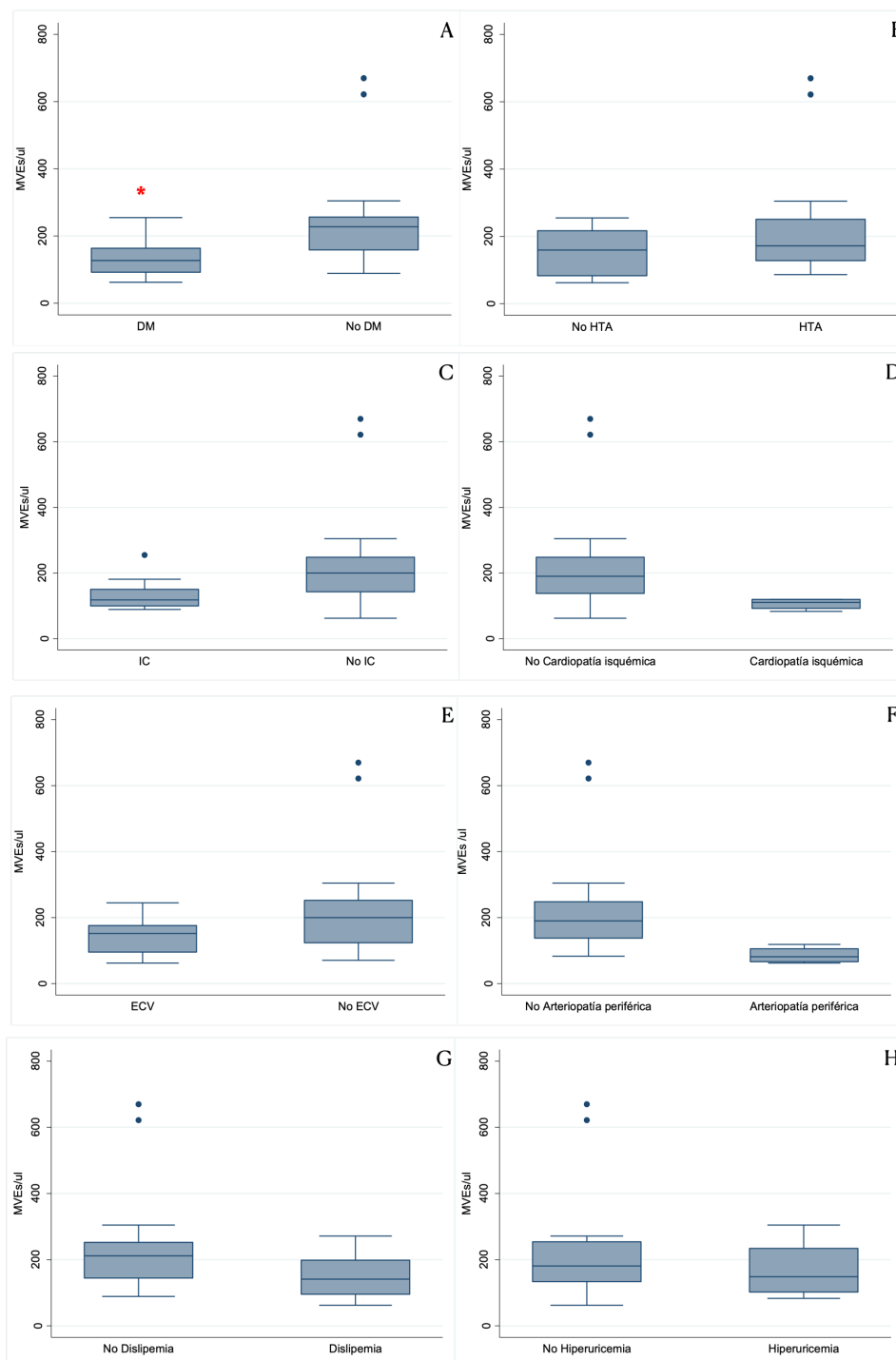
Asimismo, no encontramos una asociación con la etiología de la ERC ni con los antecedentes de cardiopatía isquémica, artropatía periférica e HTA (*Figura 14*). A pesar de ello, si observamos que los pacientes diabéticos presentan una menor cantidad de MVEs respecto a los no diabéticos, 127 MVEs/ μ l [92,5 – 163,5] frente a 228 MVEs/ μ l [159 - 257] $p < 0,05$ (*Figura 14 A*).

Respecto a factores de riesgos cardiovascular modificables, no hay diferencias en los niveles séricos de MVEs, entre el grupo de fumadores frente al de no fumadores. De la misma forma tampoco existen diferencias entre pacientes bebedores y abstemios. Respecto al índice de masa corporal (IMC), al separar en dos grupos según por normopeso o sobrepeso/obeso, encontramos que hay niveles más elevados de MVEs en los pacientes con un IMC < 25 $p 0,02$. Si realizamos un coeficiente de correlación de rango de Kendall, encontramos que a mayor IMC menores son los niveles de MVEs, disminuyendo 6,7 las MVEs por cada punto de aumento de IMC con una $p 0,02$ (*Figura 15*).

Respecto a la edad, encontramos una correlación negativa entre la edad y los niveles de MVEs, test de Spearman $p < 0,05$ (*Figura 16*). En la *Figura 17* se representan los valores de las MVEs por terciles de edad, comprendiendo el 1º tercil < 50 años y el 3º tercil de edad > 70 años. El grupo del 2º y 3º tercil presentan menores niveles de MVE $p 0,001$ (grupo 1 vs 3 $p 0,002$ / grupo 2 vs 3 $p < 0,001$).

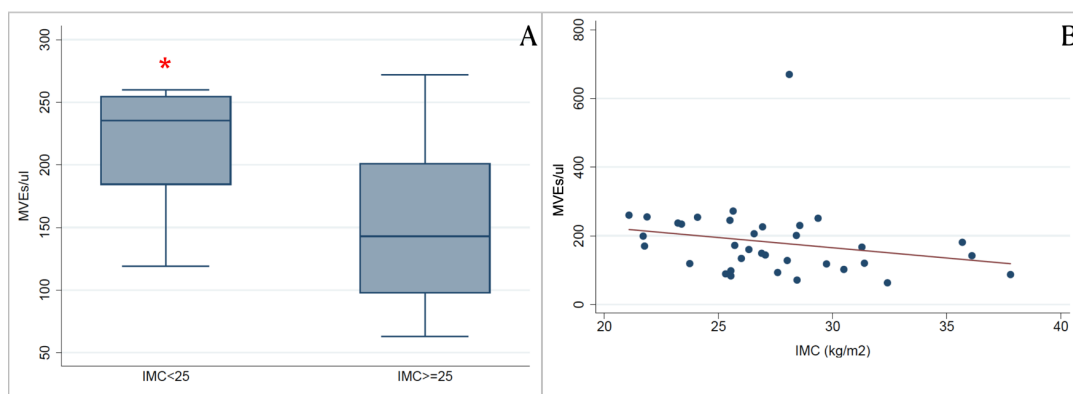
Los pacientes diabéticos eran significativamente mayores que los pacientes con ERC por otra etiología, con una diferencia de casi 30 años. Por otro lado, el grupo de pacientes diabéticos presentaban valores de colesterol y proteínas totales más bajos, mayores niveles de proteinuria y mayor porcentaje al analizar los antecedentes de insuficiencia cardíaca y arteriopatía periférica. No se encontraron otras diferencias significativas en los datos demográficos de esta subpoblación (*Tabla 6*).

Figura 14. Niveles de MVEs y las diferentes comorbilidades.



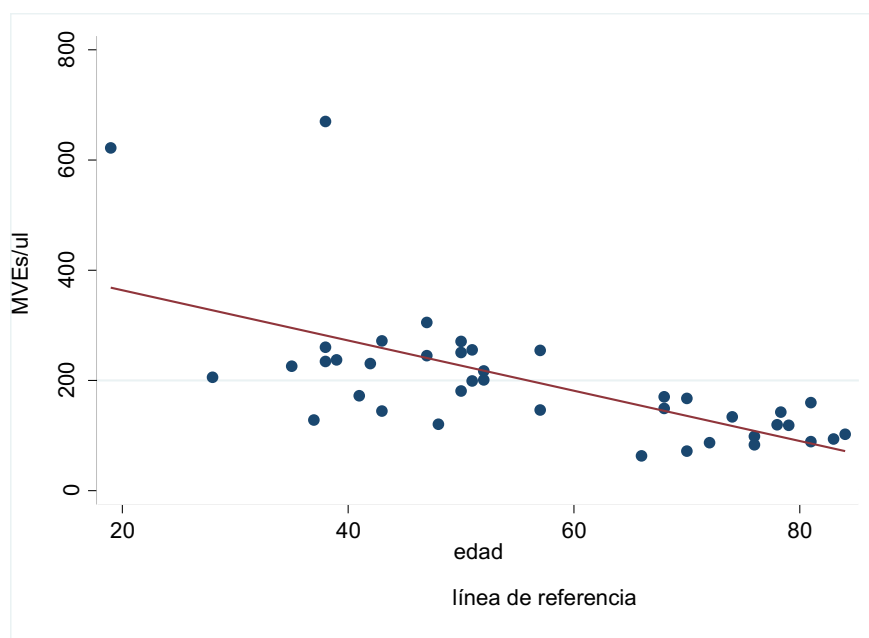
Como podemos observar las distintas comorbilidades como la HTA (B), insuficiencia cardíaca (C), antecedente de cardiopatía isquémica (D), entre otras (E)(F)(G)(H) no afectan los niveles de MVEs. Solo el grupo de los Diabéticos (A) presenta una menor cantidad de MVEs respecto a los no diabéticos, * $p < 0,05$. Los outliers se representan con puntos. MVEs: microvesículas endoteliales; DM: diabetes mellitus; HTA: hipertensión arterial; IC: insuficiencia cardíaca; ECV: enfermedad cerebro vascular.

Figura 15. Niveles de MVEs y su relación con el índice de masa corporal.



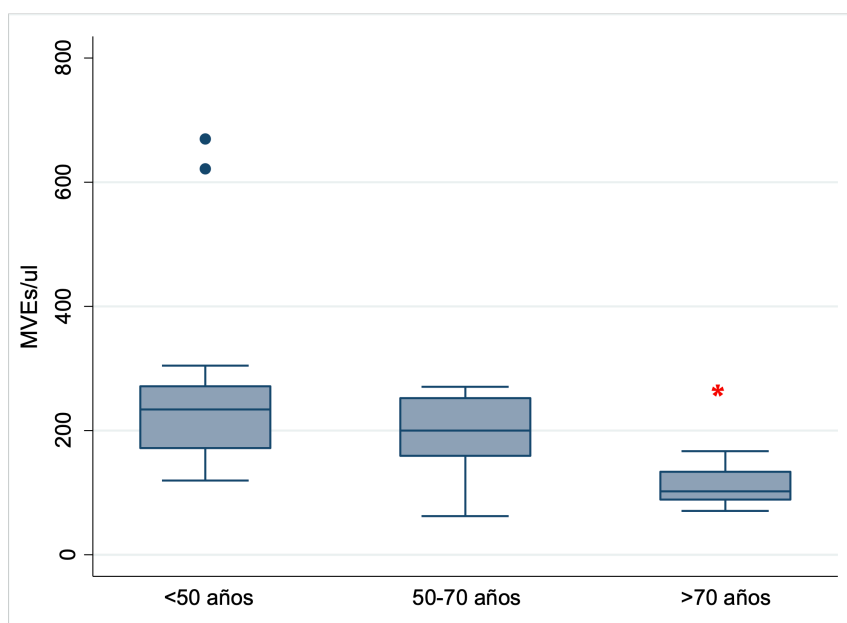
(A) El grupo catalogado como peso normal ($IMC < 25$) presenta mayores niveles de MVEs * $p < 0,02$. (B) El coeficiente de correlación de rango de Kendall muestra que a mayor IMC menor niveles de MVEs, * $p < 0,02$. MVEs: microvesículas endoteliales; IMC: índice de masa corporal.

Figura 16. Relación lineal entre la edad y niveles de MVEs. Gráfico de puntos y línea de referencia.



En rojo podemos observar la línea de referencia. MVEs: microvesículas endoteliales.

Figura 17. Niveles de MVEs y la edad.



Se ha separado la edad por terciles, 1.º tercil a < 50 años y 3.º tercil > 70 años. * $p < 0,001$.

Los *outliers* se representan con puntos. MVEs: microvesículas endoteliales.

Por tanto, las MVEs están aumentadas en la ERC, pero no hemos podido establecer una asociación con los diferentes estadios de la misma. Sin embargo, si parece depender de factores como la comorbilidad asociada o la edad.

Trataremos ahora de situar la MVEs en el contexto de los reguladores de la actividad inflamatoria endotelial.

TABLA 6. Características basales de los pacientes diabéticos y no diabéticos con ERC no dependiente de diálisis.

Características basales	No Diabéticos	Diabéticos	p-valor
n	25,0	16,0	
Hombres (%)	64,0	87,5	0,1
Edad (Mediana [RIC])	43,5 [38,5- 52,5]	71,5 [67,5-77,5]	<0,001
Edad >50 años (%)	32,0	87,5	0,001
HTA (%)	80,0	68,8	0,4
Hiperuricemia (%)	52,0	43,8	0,6
Dislipemia (%)	28,0	81,3	0,01
Insuficiencia Cardíaca (%)	8,0	37,5	0,02
Enfermedad arterial periférica (%)	8,0	12,5	0,6
Enfermedad cerebro vascular (%)	12,0	31,3	0,1
Cardiopatía isquémica (%)	4,0	18,8	0,1
FGe CKD-EPI (Mediana)	33,9 [26,4 - 52,0]	22,0 [12,8-36,05]	0,02
CT mg/dl (Mediana [RIC])	190,0 [161,0 -214,0]	145,0 [123,0-170,5]	<0,001
CT >200 mg/dl (%)	32,0	0,0	0,01
Triglicéridos (Mediana [RIC])	112,0 [71,0- 159,0]	105,0 [84,0 - 158,0]	0,91
Urea mg/dl (Mediana [RIC])	83,0 [61,0 - 96,0]	80,5 [57,5 - 127]	0,62
Ferritina ng/ml (Mediana [RIC])	122,0 [50,0-156,0]	161,0 [78,0 - 178,0]	0,21
IST % (Mediana [RIC])	25,0 [20,0 - 34,0]	20,0 [15,0- 37,0]	0,77
PTHi pg/ml (Mediana [RIC])	104,0 [72,0 -189,0]	242,0 [132,0 -333,0]	0,01
Fósforo mg/dl (Mediana [RIC])	3,5 [3,2 - 4,1]	3,6 [3,4 - 4,2]	0,41
Hemoglobina g/dl (Mediana [RIC])	13,9 [12,8 -14,7]	12,7 [11,3 -14,1]	0,04
Leucocitos /uL (Mediana [RIC])	6745,0 [5600,0 -7855,0]	7190,0 [5430,0 -8300,0]	0,69
Linfocitos /uL (Mediana [RIC])	2030 ,0[1560,0- 2540,0]	1535,0 [1095,0 - 2075,0]	0,06
Albumina g/dl (Mediana [RIC])	4,4 [4,2-4,5]	4,1 [3,95- 4,25]	0,004
Proteínas totales g/dl (Mediana [RIC])	7,3 [6,9 -7,5]	6,8 [6,4 - 6,9]	0,001
Acido úrico mg/dl (Mediana [RIC])	7,2 [6,7 - 8,8]	6,7 [5,7 - 8,2]	0,20
Sodio mmol/L (Mediana [RIC])	140,0 [139,0- 142,0]	142,5[140,0 -143,0]	0,11
Potasio mmol/L (Mediana [RIC])	4,8 [4,7 -5,1]	4,7 [4,1- 5,4]	0,60
Lactato deshidrogenasa U/L (Mediana [RIC])	329,5 [282 - 364,5]	381,0 [303,5 - 443,5]	0,08
HbA1c % (Mediana [RIC])	5,4 [5,1-5,6]	7,2 [6,0 - 8,2]	0,04
Pro/Cro mg/g (Mediana [RIC])	32,0 [18,5- 436,7]	300,1 [136,8 - 963,3]	0,01

HTA: hipertensión arterial; CT : colesterol total; FGe : Filtrado glomerular estimado por CKD-EPI ml/min/1,73 m2; HbA1c: hemoglobina glicosilada; IST: índice de saturación de transferrina; PTHi; hormona paratiroidea intacta; Pro/Cro: cociente proteínas/ creatinina en orina; RIC: rango intercuartílico.

5.2. Relación de las Microvesículas Endoteliales y otros parámetros analíticos y biomarcadores asociados a la disfunción endotelial

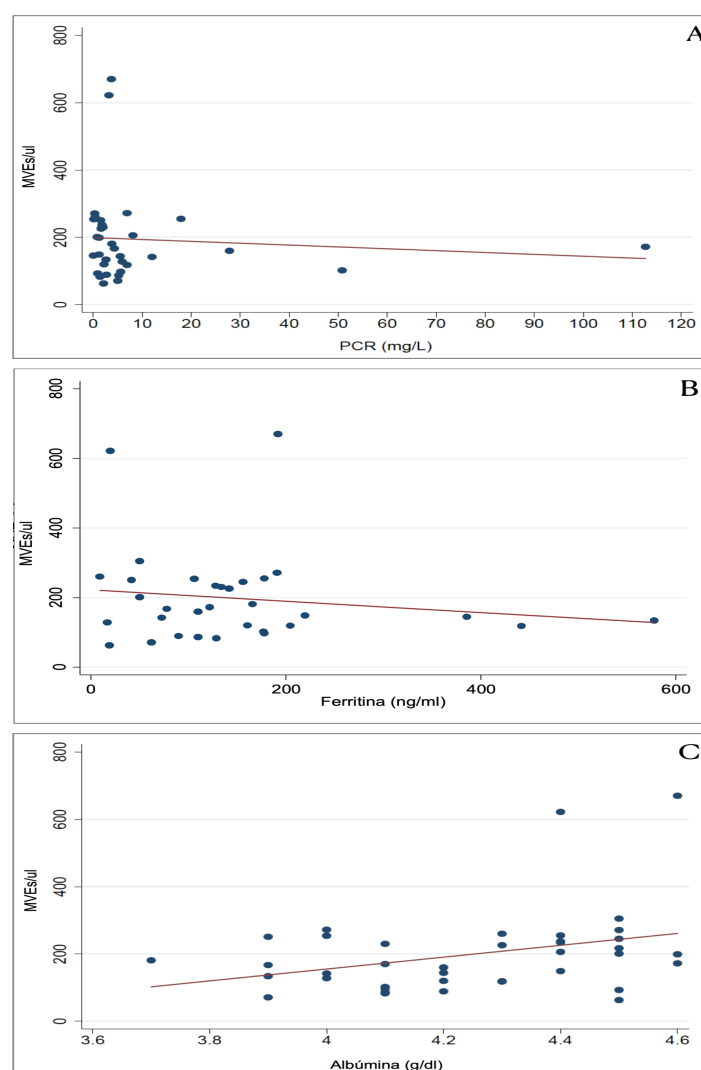
5.2.1. Microvesículas Endoteliales y parámetros analíticos

Respecto a los valores analíticos protocolizados para el programa de seguimiento clínico habitual, no se objetivó asociación de las MVEs con los valores de hemoglobina, ácido úrico, fósforo, calcio, ferritina, PCR, ni con los valores de proteinuria medida como cociente proteínas en orina / creatinina en orina (*Figura 18*). Si encontramos una asociación positiva entre el recuento de MVEs y niveles de Colesterol total p 0,02

(Figura 19). Cabe recalcar, como se mencionó previamente, que los pacientes se encontraban en una situación estable, pudiendo ser la principal causa de la normalidad en los niveles de proteína C reactiva, en la mayoría de la población estudiada, demostrando una vez más la complejidad de las MVEs.

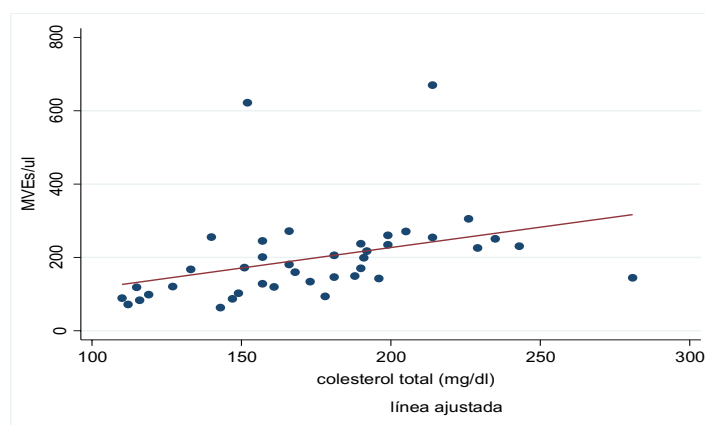
Se continua el análisis con el estudio de el AOPP y el VEGF. Los AOPP son un marcador de oxidación e inflamación, ya descrito en la población con ERC que además cuenta con una técnica de medición estandarizada y fácilmente reproducible, pero su relación con las MVEs no se ha descrito en esta población. En lo referente a la proteína señalizadora VEGF, importante protagonista en regulación de la angiogénesis, se ha descrito su relación con las microvesículas plaquetarias, pero no así con las MVEs.

Figura 18. Correlación lineal entre niveles de MVEs y parámetros analíticos.



Se puede observar que no existe relación con la proteína C reactiva (A), ferritina (B), ni con la albúmina sérica (C). MVEs: microvesículas endoteliales; PCR: proteína C reactiva.

Figura 19. Correlación lineal entre niveles de MVEs y niveles de colesterol.



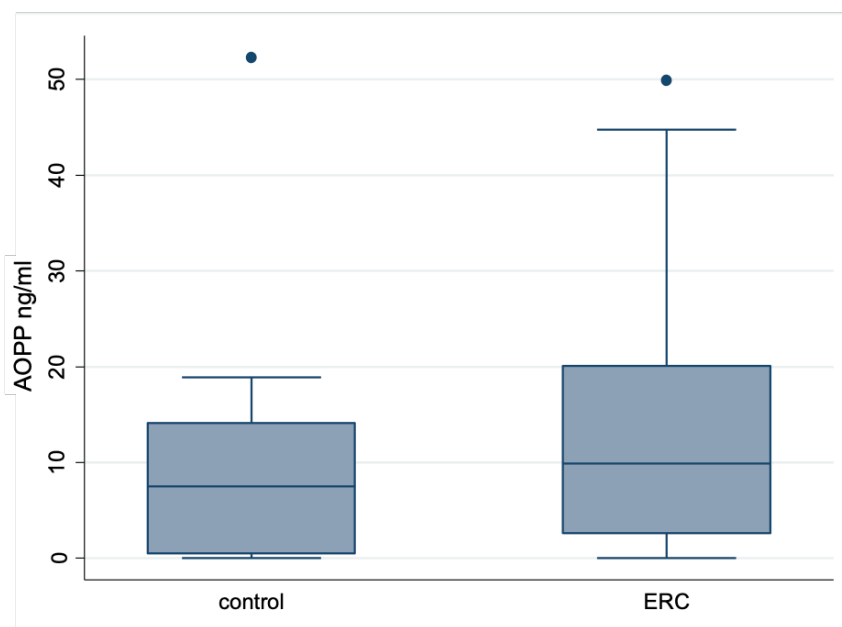
5.2.2. Productos avanzados de oxidación proteica en la Enfermedad renal crónica y su relación con las Microvesículas endoteliales

Los niveles de AOPP están elevados en la ERC 9,91 mg/ml [2,57 – 20,07] vs 7,51 ng/ml [0,50 – 14,10], sin alcanzar la significación estadística (*Figura 20*).

Debido a estudios previos, decidimos valorar su comportamiento en la población diabética, observando un predominio de AOPP, en diabéticos 13,40 ng/ml [2,67 - 33,0] vs no diabéticos 5,06 ng/ml [2,07 - 15,48] sin llegar a ser estadísticamente significativo $p = 0,1$ (*Figura 21*).

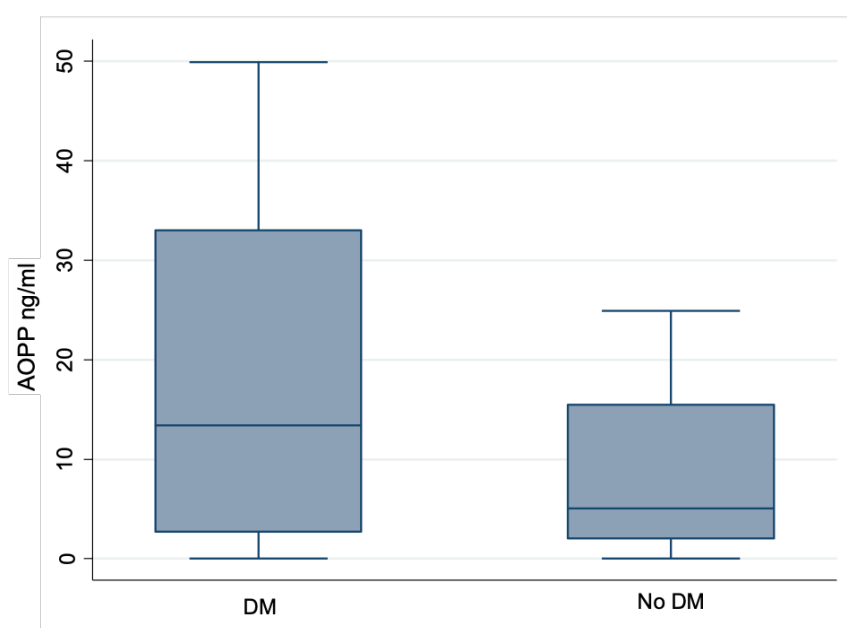
No se encontró una relación entre los niveles de MVE y los AOPP como podemos ver en la gráfica a continuación (*Figura 22*).

Figura 20. Niveles de AOPP en la población ERC no dependiente de diálisis.



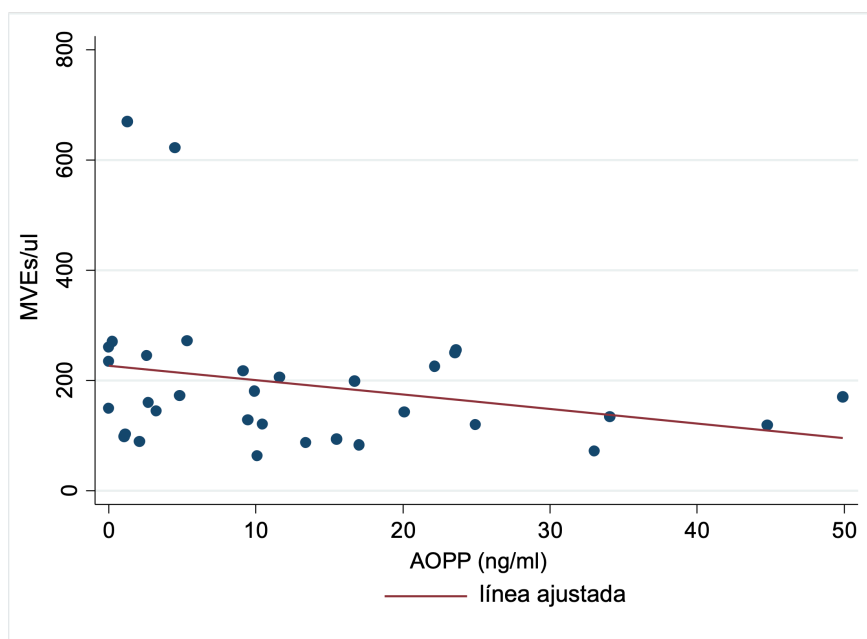
Existe una tendencia de mayores niveles de AOPP en la población con ERC sin alcanzar la significación estadística. Los outliers se representan con puntos. AOPP: productos avanzados de oxidación proteica; ERC: enfermedad renal crónica.

Figura 21. Niveles de AOPP en la población diabética con ERC no dependiente de diálisis.



AOPP: productos avanzados de oxidación proteica; DM: diabetes mellitus.

Figura 22. Relación de las MVEs y AOPP en la ERC no dependiente de diálisis.



AOPP: productos avanzados de oxidación proteica; MVEs: microvesículas endoteliales.

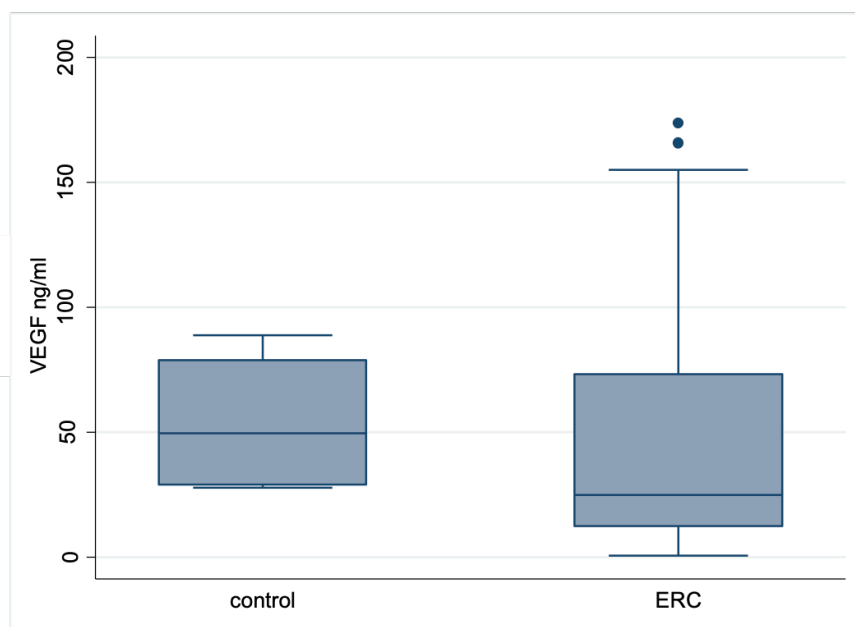
5.2.3. Factor de crecimiento endotelial vascular en la Enfermedad renal crónica y su relación con las MVEs

No hemos encontrado diferencias en los niveles séricos de VEGF, entre los grupos de ERC y control (*Figura 23*); ERC 24,9 ng/ml [12,4 - 73,3] vs grupo control 49,6 ng/ml [29,0- 78,95]. Tampoco se ha objetivado asociación con los valores de MVEs ni variaciones de los niveles séricos de los pacientes diabéticos (*Figura 24 y 25*).

Se ha comprobado como las MVEs están aumentadas en ERC, correlacionándose con la edad y la comorbilidad del paciente más que con el grado de ERC. También hemos visto que se asocia con la dislipidemia, no así con estados previos de cardiopatía isquémica ni antecedentes de enfermedad cerebro vascular.

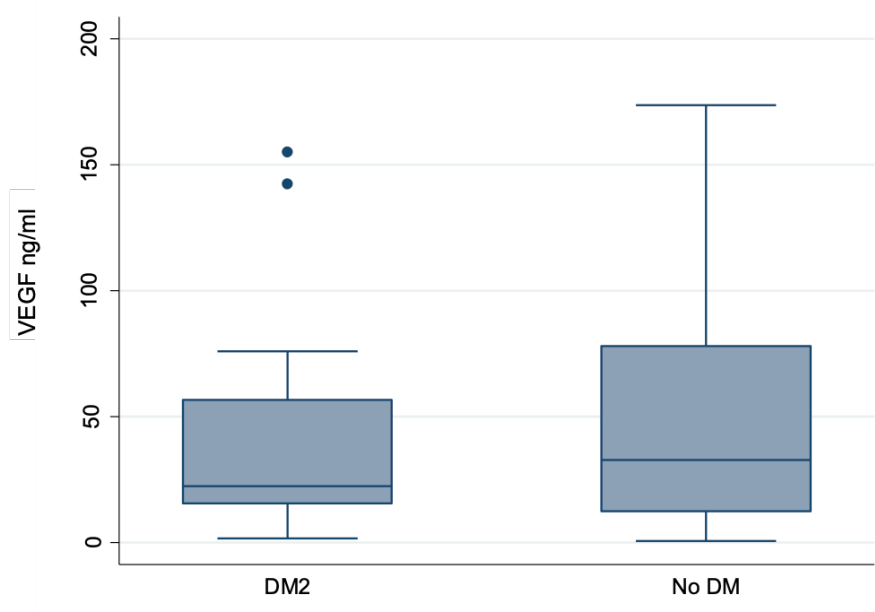
No hemos encontrado asociación con los marcadores de inflamación aguda utilizados en la vida diaria, como son los niveles de ferritina, albúmina y PCR. Esto podría apoyar que las MVEs son un indicador, más sensible y precoz de inflamación o disfunción endotelial que de un estado inflamatorio subclínico, a pesar de no existir unos valores de normalidad para este biomarcador.

Figura 23. Niveles de VEGF en la ERC no dependiente de diálisis.



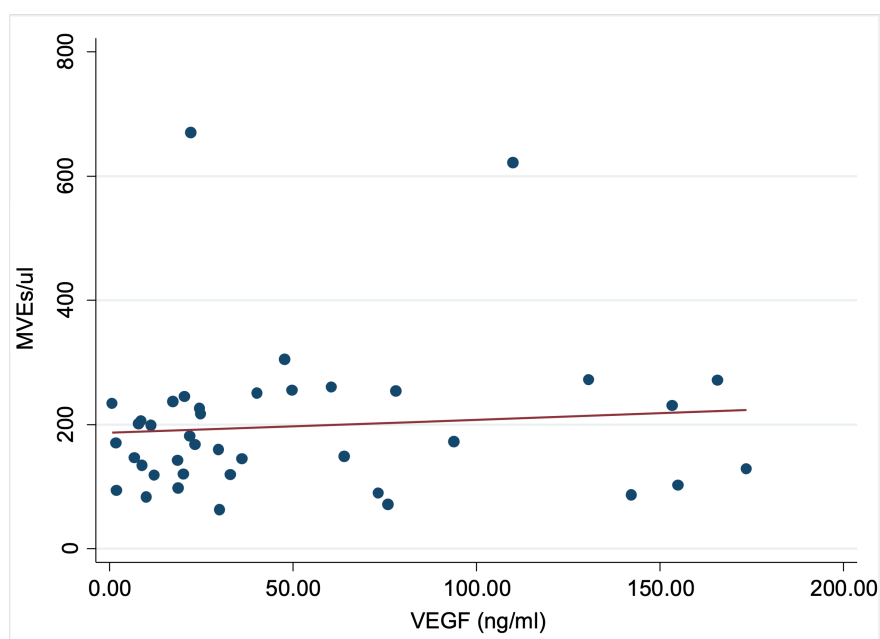
Los *outliers* se representan con puntos. VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular; ERC: enfermedad renal crónica.

Figura 24. Niveles de VEGF en la población diabética con ERC no dependiente de diálisis.



Los *outliers* se representan con puntos. DM: diabetes mellitus; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

Figura 25. Relación con MVEs y VEGF en la ERC no dependiente de diálisis.



MVEs: microvesículas endoteliales; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

Es notorio que los pacientes diabéticos tienen menor cantidad de MVEs en esta población estudiada y al realizar una comparativa entre DM y no DM, el grupo de diabéticos presenta menor nivel de colesterol total. Este sesgo se debe probablemente a un tratamiento médico más agresivo, como recomiendan las guías clínicas en este grupo de pacientes.

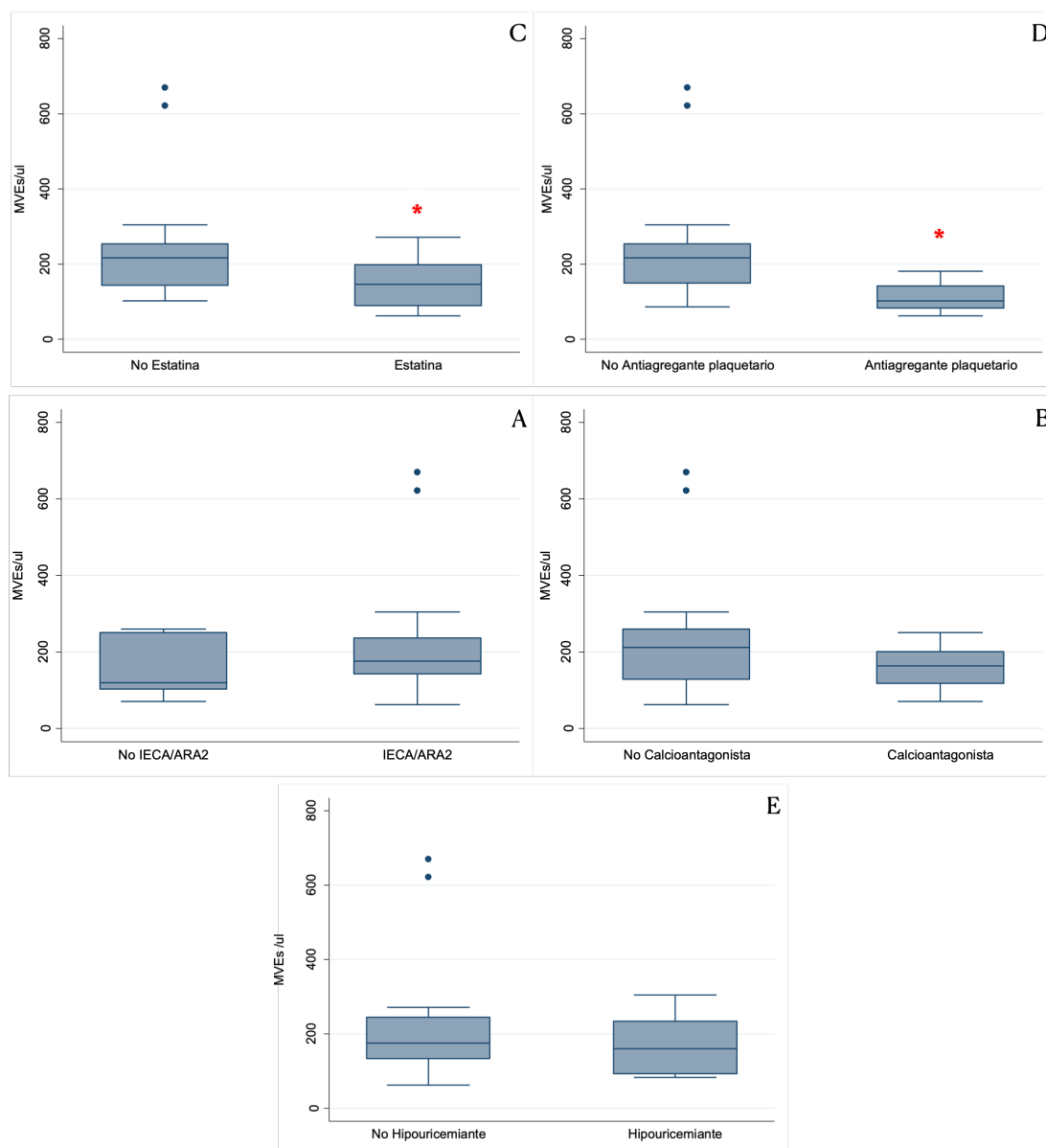
En el siguiente apartado pasamos a analizar si existe alguna asociación entre los niveles de MVEs y los fármacos empleados.

5.3. Repercusión de los medicamentos habituales sobre las Microvesículas endoteliales y otros marcadores

5.3.1. Niveles de Microvesículas endoteliales y tratamiento médico recibido

Al analizar la población con enfermedad renal crónica no encontramos diferencias en función del tratamiento recibido, para IECAs / ARaII, diuréticos, hipouricemiantes, vitamina D, ni eritropoyetina. El grupo de pacientes que reciben Estatina o Antiagregantes plaquetarios presentan menor cantidad de MVEs, $p < 0,05$, como se observa en la *Figura 26*.

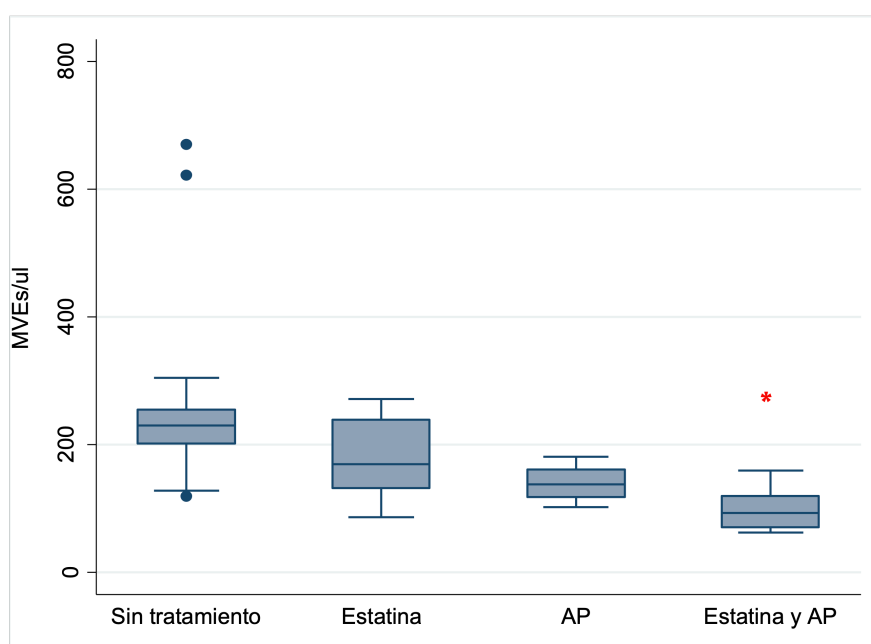
Figura 26. Niveles de MVEs y tratamiento médico recibido en la ERC no dependiente de diálisis.



Como podemos observar los principales fármacos antihipertensivos no modifican los niveles de MVEs (A)(B), ni los hipouricemiantes (E), solo el tratamiento con estatinas y antiagregantes plaquetarios (C)(D) modifican los niveles de MVEs. Los outliers se representan con puntos y la $p < 0,05$ se representan con *. MVEs: microvesículas endoteliales; IECA: inhibidores de la enzima angiotensina; ARA2: antagonistas de los receptores de angiotensina 2.

El tratamiento con estatinas y antiagregantes plaquetarios afecta disminuyendo significativamente la cantidad de MVEs. Los niveles para cada grupo fueron: sin tratamiento 230 MVEs/ μ L (201 - 255); estatina 169,5 MVEs/ μ L (132 – 239,5); antiagregantes plaquetarios 138 MVEs/ μ L (118 – 161,5); estatina y antiagregantes plaquetarios 93 MVEs/ μ L (71 - 120) con una $p < 0.001$ según test Kruskal-Wallis. El análisis post hoc, con el Test de los rangos con corrección de Bonferroni, indica diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de estatinas y antiagregantes plaquetarios en comparación con los que no reciben tratamiento $p < 0,001$ (Figura 27).

Figura 27. Niveles de MVEs en pacientes ERC no dependientes de diálisis en tratamiento con estatina y antiagregantes plaquetarios.



Los *outliers* se representan con puntos y la $p < 0,05$ se representan con *. AP: antiagregantes plaquetarios; MVEs: microvesículas endoteliales.

Para evitar el sesgo que puede introducir el colesterol, analizamos los valores MVEs en aquellos pacientes con un colesterol controlado ($CT < 200$ mg/dl). Aquellos tratados con estatinas presentaban niveles más bajos de MVEs (133 MVEs/ μ L [89 - 172] vs 191 MVEs/ μ L [134 - 237] MVEs/ μ L p 0,032). Mediante regresión lineal, se observa en la Tabla 7, que los pacientes en tratamiento con estatinas o antiagregantes plaquetarios tenían menor niveles circulantes de MVEs, ajustado por los niveles de séricos de colesterol total ($\beta = -97,81$ IC - 181,8711 a - 13,75583).

Tabla 7. Regresión Lineal, entre niveles de MVEs y el tratamiento con estatinas y Antiagregantes plaquetarios, ajustado por colesterol.

<i>MVEs</i>	<i>Coef.</i>	<i>Std. Err.</i>	<i>t</i>	<i>p</i>	<i>[95 % Conf. Interval]</i>	
Estatinas y Antiagregantes	-97,81346	41,48551	-2.36	0,024	-181,8711	-13,75583

Coef: Coeficiente; MVEs: microvesículas endoteliales; Std. Err: error estándar; t: estadístico t.

En la *Tabla 8* se describen las características basales según tratamiento recibido. Los pacientes en tratamiento con estatinas o antiagregantes plaquetarios eran mayores, con mayor porcentaje de diabetes mellitus y niveles de colesterol sérico total más bajos.

Para eliminar el sesgo producido por la edad, respecto a los tratamientos recibidos, estratificamos por terciles de edad y observamos que los niveles de MVEs se ven disminuidos en aquellos pacientes en tratamiento con estatinas y antiagregantes plaquetarios, en todos los grupos de edad, aunque solo alcanzan significación estadística en el 2º tercil de edad (50 -70 años) como se muestra en la Figura 28 (Test de tendencia Ktau < 0,05).

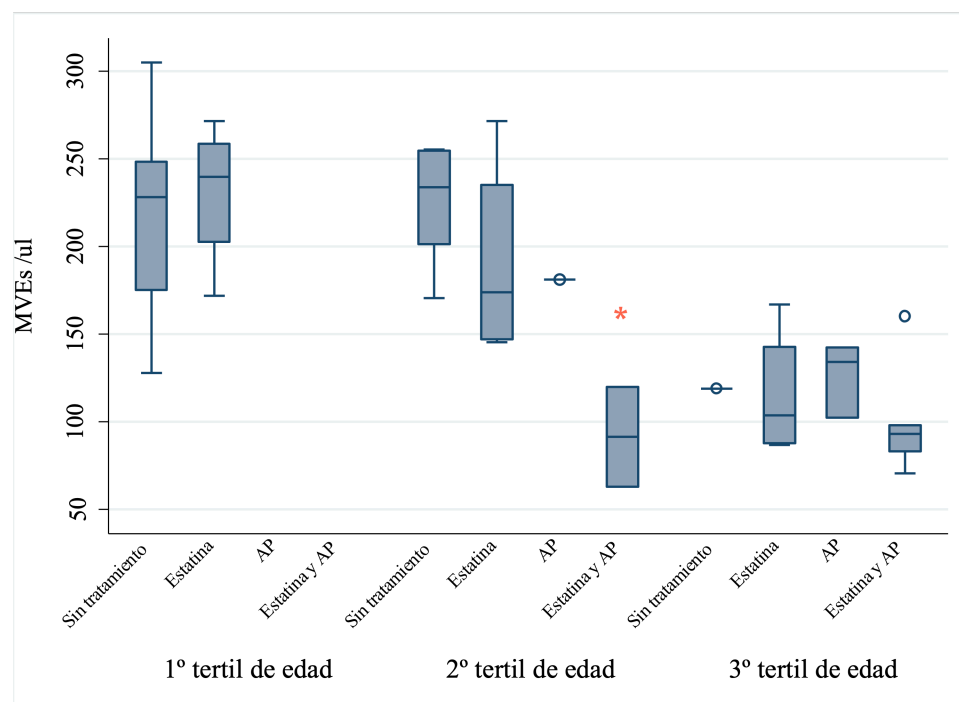
De igual manera decidimos separar en subgrupos los diabéticos y no diabéticos. Así encontramos que un 62,5 % de los diabéticos estaban en tratamiento con estatina y antiagregantes plaquetarios, a diferencia de los catalogados como no diabéticos en lo que ninguno tenía tratamiento con antiagregantes plaquetarios. No realizamos más subanálisis debido a que la n de nuestro estudio no lo permite.

Tabla 8. Características basales de los pacientes según tratamiento recibido.

	Sin tratamiento	Estatina	AP	Estatina y AP	Total	p-valor
n	18,0	12,0	4,0	7,0	41,0	
Hombres (%)	61,1	83,3	100,0	71,4	73,2	0,3
Edad (Mediana [RIC])	43,0 [37,5-52,5]	54,5 [45,5-71,5]*	76,5 [62,5-81,5]*	76,5 [66,5-81,5]*	51,5 [42,4-72,5]	0,002
Edad >50 años (%)	33,3	58,3	75,0	85,7	53,7	0,1
HTA (%)	72,2	91,7	100,0	42,9	75,6	0,7
DM (%)	11,1	33,3	100*	85,7*	39,0	<0,001
Hiperuricemia (%)	50,0	58,3	25,0	42,9	48,8	0,7
Dislipemia (%)	22,2	66,7*	50,0*	85,7*	48,8	0,02
Cardiopatía isquémica (%)	5,6	0,0	25,0	28,6	9,8	0,1
Insuficiencia cardíaca (%)	11,1	16,7	50,0	28,6	19,5	0,3
Arteriopatía periférica (%)	5,6	0,0	0,0	42,9*	9,8	0,01
Enfermedad cerebro vascular (%)	5,6	16,7	50,0	42,9*	19,5	0,07
Estratificación por tramos de FGe CKD-EPI (%)						
<30 ml/min/1,73 m2	38,9	41,7	100,0	57,1	48,8	0,4
31-44 ml/min/1,73 m2	16,7	41,7	0,0	42,9	26,8	
45-59 ml/min/1,73 m2	27,8	8,3	0,0	0,0	14,6	
>60 ml/min/1,73 m2	16,7	8,3	0,0	0,0	9,8	
Colesterol total mg/dl (Mediana [RIC])	191,0 [161,0-226,0]	161,5 [140,0-189,5]*	162,0 [150,0-184,5]	127,0 [116,0-168,0]*	173,0 [149,0-196,0]	0,005
Colesterol total >200 mg/dl (%)	38,9 \$	8,3	0,0	0,0	19,5	0,05

HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; FGe: filtrado glomerular estimado por CKD-EPI ml/min/1,73 m2; RIC: rango intercuartílico. Se consideran valores significativos con un valor p<0,05. * Significativo respecto al grupo sin tratamiento; \$ Significativo frente a algún tratamiento.

Figura 28. Niveles de MVEs según tratamiento médico recibido y terciles de edad en pacientes ERC no dependiente de diálisis.



Los *outliers* se representan con puntos. Test de tendencia Ktau * $p < 0,05$. AP: antiagregantes plaquetarios; MVEs: microvesículas endoteliales.

5.3.2. Niveles de Productos avanzados de oxidación proteica según tratamiento recibido

No hubo variaciones estadísticamente significativas de los niveles de AOPP en los pacientes en tratamiento con estatinas o con antiagregantes plaquetarios, como podemos observar en la *Figura 29* que se muestra a continuación. ANOVA $p > 0,7$.

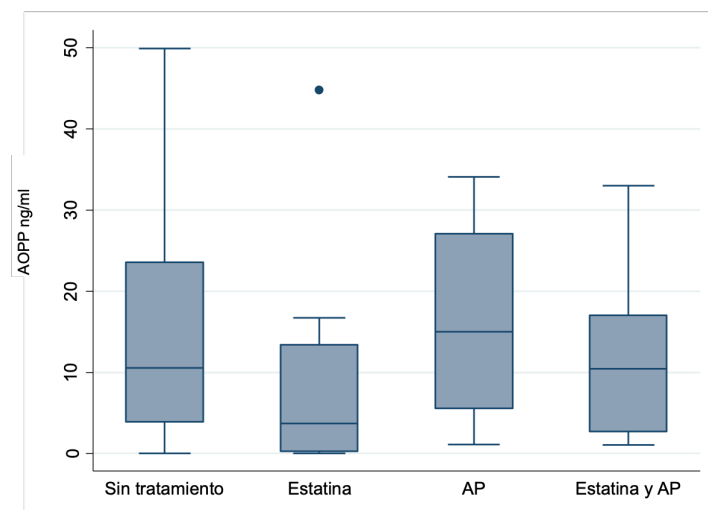
5.3.3. Niveles de Factor de crecimiento endotelial vascular y tratamiento recibido

El tratamiento con estatinas y antiagregantes plaquetarios tuvo un efecto sobre los niveles séricos de VEGF similar al observado en las MVEs circulantes (*Figura 30*) aunque sin alcanzar significación estadística $p > 0,6$.

Como podemos observar las estatinas y los antiagregantes plaquetarios modifican los valores de MVEs y lo hacen independientemente de los niveles de colesterol total. Lamentablemente, al tener el limitante de la n en este estudio, no hemos podido realizar mayores análisis con la población diabética, dejando la puerta

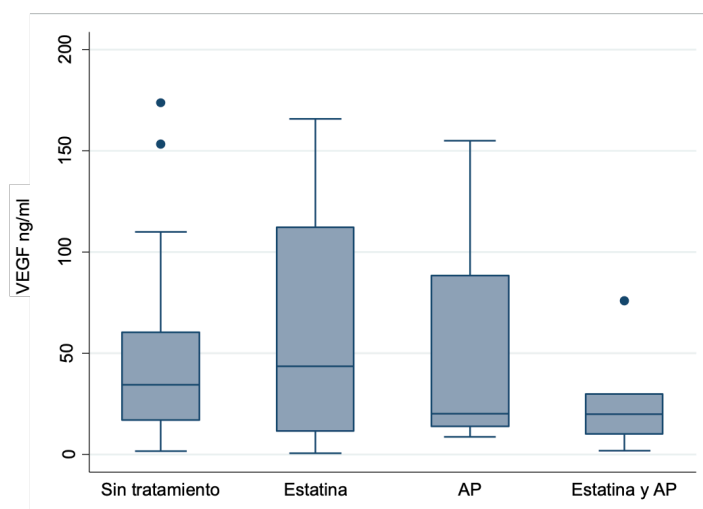
abierta a continuar investigando el comportamiento de las MVEs en esta población tan susceptible de enfermedad cardiovascular.

Figura 29. Niveles de AOPP en pacientes ERC no dependiente de diálisis en tratamiento con estatina y antiagregantes plaquetarios.



Los outliers se representan con puntos. AOPP: productos avanzados de oxidación proteica; AP: antiagregantes plaquetarios.

Figura 30. Niveles de VEGF en pacientes ERC no dependiente de diálisis en tratamiento con estatina y antiagregantes plaquetarios.



Los outliers se representan con puntos. AP: antiagregantes plaquetarios; VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular.

5.4. Las Microvesículas Endoteliales y la Hemodiálisis

Una vez demostrado que los niveles séricos de MVEs están elevados en ERC y que se ven afectados por los tratamientos farmacológicos, quisimos valorar si la corrección de la uremia mediante la hemodiálisis modificaba los valores de las MVEs.

5.4.1. Características basales de la población estudiada

La población estudiada en Hemodiálisis estaba conformada por 30 pacientes. Las características basales de los pacientes en HD se muestran a continuación en la *Tabla 9*. Eran pacientes más mayores y con mayor comorbilidad que los pacientes con ERC no dependiente de diálisis. Un 83,3 % estaban en hemodiafiltración (HDF) on line y un 33,3 % tenía como acceso vascular un catéter venoso central.

Podemos observar en la *Tabla 10*, que se muestra a continuación, la prevalencia de los distintos fármacos en los pacientes en programa de hemodiálisis. Se puede observar un descenso de la prevalencia de tratamiento con IECA / ARA2 respecto al grupo ERC y un mayor porcentaje de pacientes con antiagregantes plaquetarios.

TABLA 9. Características basales de los pacientes en Hemodiálisis.

Características basales	n 30
Hombres (%)	36,7
Edad (Mediana [RIC])	71,0 [60,0-78,0]
Edad >50 años (%)	83,3
Catéter venoso central (%)	33,3
Hemodiálisis Online (%)	83,3
Hipertensión arterial (%)	86,7
Diabetes mellitus (%)	53,3
Hiperuricemia (%)	13,3
Dislipemia (%)	43,3
Insuficiencia cardíaca (%)	43,3
Arteriopatía periférica (%)	36,7
Enfermedad cerebro vascular (%)	16,7
Cardiopatía isquémica (%)	23,3
Colesterol total mg/dl (Mediana [RIC])	152,0 [135,0-183,0]
Colesterol total >200 mg/dl (%)	16,7
Triglicéridos mg/dl (Mediana [RIC])	158,5 [98-210]
Urea mg/dl (Mediana [RIC])	129,0 [99,0-157,0]
Ferritina ng/ml (Mediana [RIC])	368,0 [289,0-559,0]
IST % (Mediana [RIC])	16,3 [13,8-25,6]
PTHi pg/ml (Mediana [RIC])	230,5 [134,0-445,0]
Fósforo mg/dl (Mediana [RIC])	4,4 [3,8-5]
Hemoglobina g/dl (Mediana [RIC])	11,7 [11,1-12,1]
Leucocitos /uL (Mediana [RIC])	6900 [5620-8480]
Linfocitos /uL (Mediana [RIC])	1250 [1000-1600]
Albúmina g/dl (Mediana [RIC])	3,8[3,5-4,0]
Proteínas totales g/dl (Mediana [RIC])	6,6 [6,3-6,8]
Acido úrico mg/dl (Mediana [RIC])	6,0 [5,7-7,1]
Sodio mmol/L (Mediana [RIC])	138 [136-141]
Potasio mmol/L (Mediana [RIC])	5,2 [4,8-5,8]
Hemoglobina glicosilada % (Mediana [RIC])	6,5 [5,3-8,5]

IST: Índice de saturación de transferrina; PTHi: hormona paratiroidea intacta; RIC: rango intercuartílico. ** Los datos son solo de pacientes diabéticos

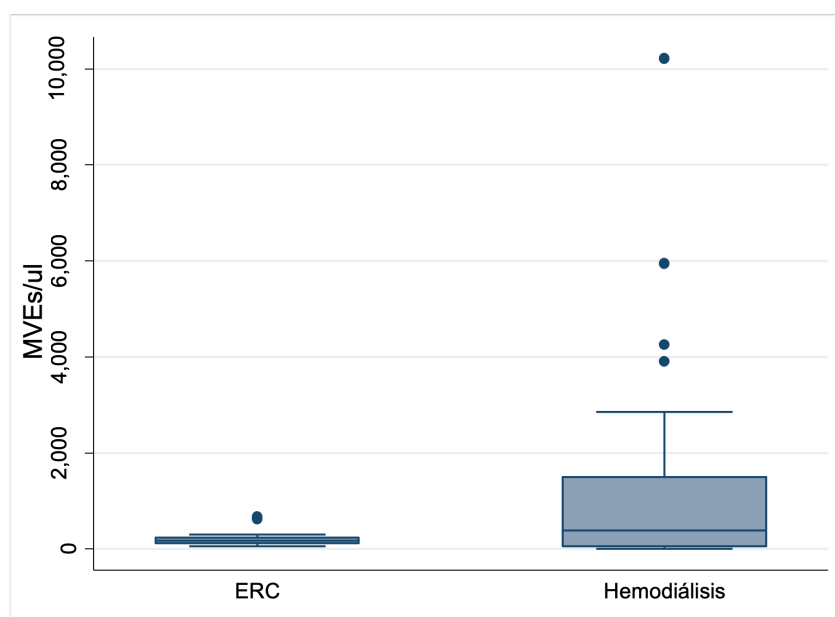
TABLA 10. Prevalencia de los distintos fármacos de la muestra de estudio en hemodiálisis.

<i>Fármacos</i>	<i>n 30</i>
IECA /ARA II (%)	26,7
Bloqueadores de canales de calcio (%)	20,0
AEEs (%)	90,0
Hipouricemiantes (%)	16,7
Estatinas (%)	46,7
Antiagregantes Plaquetarios (%)	50,0

IECA:inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina; ARA II: antagonistas de los receptores de angiotensina II; AEEs: agentes estimuladores de eritropoyetina.

5.4.2. Niveles de Microvesículas Endoteliales en los pacientes en Hemodiálisis

Los pacientes en hemodiálisis tienen un nivel elevado de MVEs, pero sin diferencias estadísticas respecto a los pacientes con ERC no dependiente de diálisis, como podemos observar en el gráfico de la *Figura 31*. HD 470 MVEs/ μ L [60 – 1800], ERC 171 MVEs/ μ L [119,5 - 241].

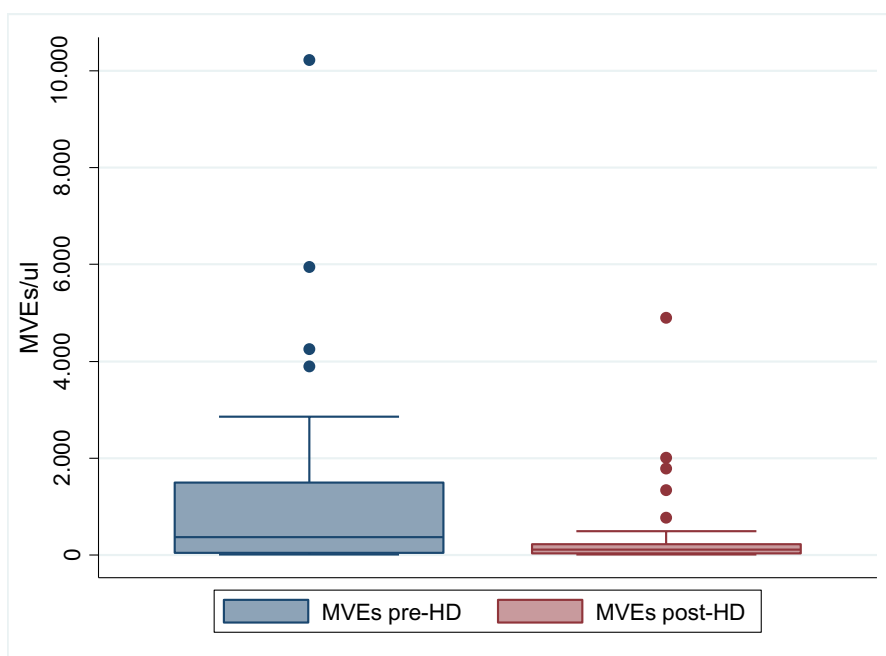
Figura 31. Niveles de MVEs en pacientes en hemodiálisis.

Los outliers se representan con puntos. ERC: enfermedad renal crónica; MVEs: microvesículas endoteliales.

Es importante enfatizar que, en el grupo de HD, hemos encontrado una gran dispersión de la muestra, lo cual dificulta encontrar diferencias al trabajar con una n de pequeño tamaño.

No encontramos relación entre MVEs y terciles de edad, ni con el tipo de acceso vascular o técnica de diálisis (Hemodiálisis estándar versus Hemodiafiltración on line). Al comparar si estos valores se modificaban con las sesiones de HD, encontramos mucha variabilidad de los niveles de MVEs. Niveles PreHD 375 MVEs/ul [50 - 1500] y niveles PostHD 115 MVEs/ul [40 - 230] sin diferencias significativas $p 0,3$ (Figura 32). Por principio físico las MVEs, debido a su tamaño, no deberían pasar por el poro dado que el tamaño promedio del poro de los dializadores usados en la actualidad. Sin embargo, podrían adherirse a la membrana o desestructurarse.

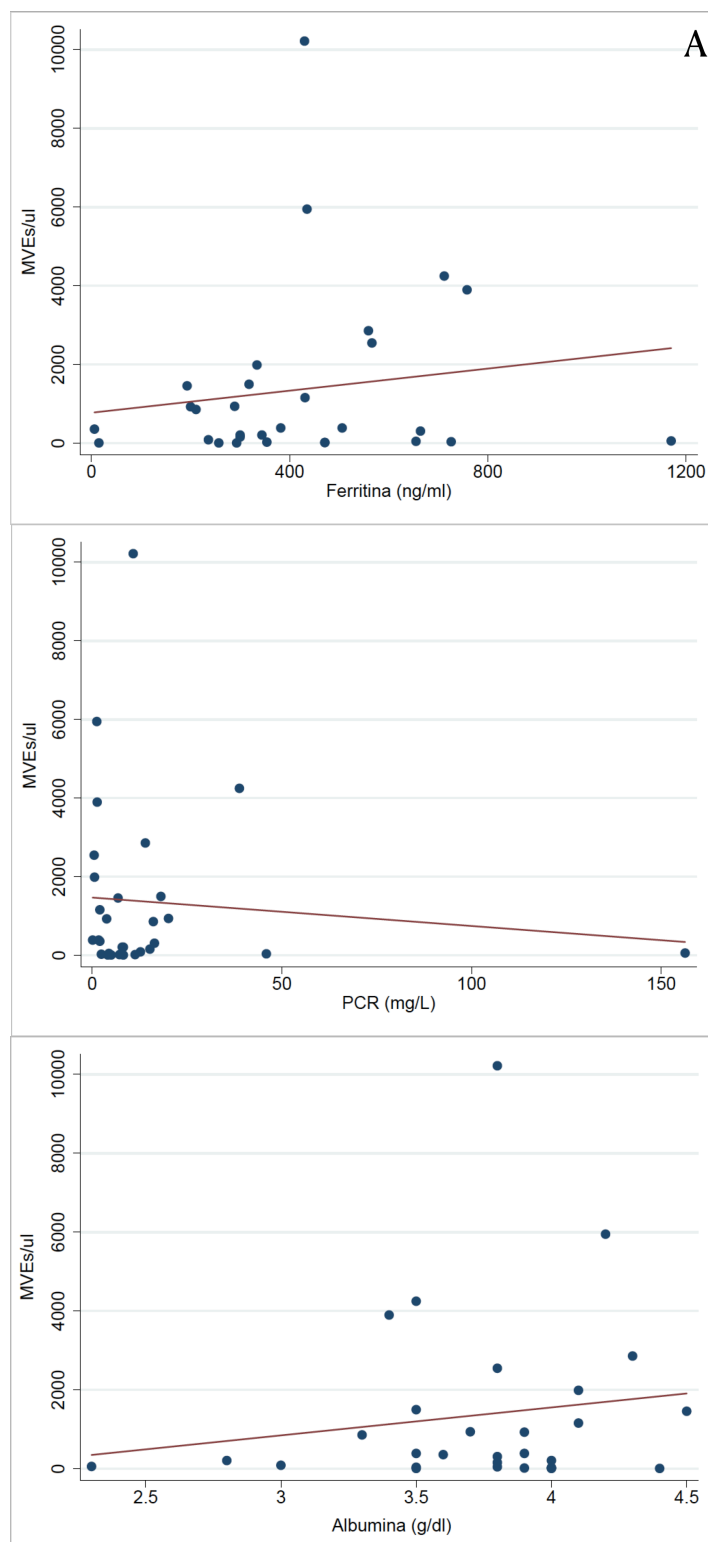
Figura 32. Niveles de MVEs pre y post hemodiálisis.



Los *outliers* se representan con puntos. HD: hemodiálisis; MVEs: microvesículas endoteliales.

Igualmente, no encontramos diferencias en la población diabética: diabéticos 350 MVEs/ul [45 - 2025] vs no diabéticos 375 MVEs/ul [90 - 1160] $p 0,9$. Así mismo, como observamos en la población con ERC no diálisis, no hay relación con la ferritina, proteína C reactiva ni la albúmina sérica (Figura 33).

Figura 33. Relación entre los niveles de MVEs y parámetros analíticos en pacientes en Hemodiálisis.



Niveles de ferritina (A), proteína C reactiva (B) y albúmina sérica (C). No hay relación con ninguno de los tres parámetros. MVEs: microvesículas endoteliales; PCR: proteína C reactiva.

5.4.3. Niveles de Microvesículas Endoteliales y tratamiento médico recibido en pacientes en Hemodiálisis

A continuación, se analiza si el efecto de los fármacos sobre las MVEs se mantiene en los pacientes sometidos a hemodiálisis. En la *Tabla 11* se pueden comprobar las características basales de la población estudiada, separadas según su tratamiento con estatinas o antiagregantes plaquetario. Se objetiva que los pacientes en tratamiento con estatinas y antiagregantes plaquetarios presentaban mayor comorbilidad.

También observamos que los antiagregantes plaquetarios y la estatina no mantienen su efecto sobre las MVEs, en este grupo de pacientes (*Figura 34*): sin tratamiento 930 MVEs/ μ l (390 - 1990); estatina 300 MVEs/ μ L (30 - 1160); antiagregante plaquetario 210 MVEs/ μ L (60 - 1460); estatina y antiagregante plaquetario 200 MVEs/ μ L (45 - 2025) con una p 0,8.

La hemodiálisis no corrige los niveles de MVEs, es más, hay una mayor dispersión de estos valores probablemente porque haya más factores que influyan en su liberación, como pueden ser: el tipo de acceso vascular, la medicación intradiálisis, el tipo de técnica de hemodiálisis, etcétera. Tal vez por ello, el efecto de los fármacos no mantiene su beneficio en esta población.

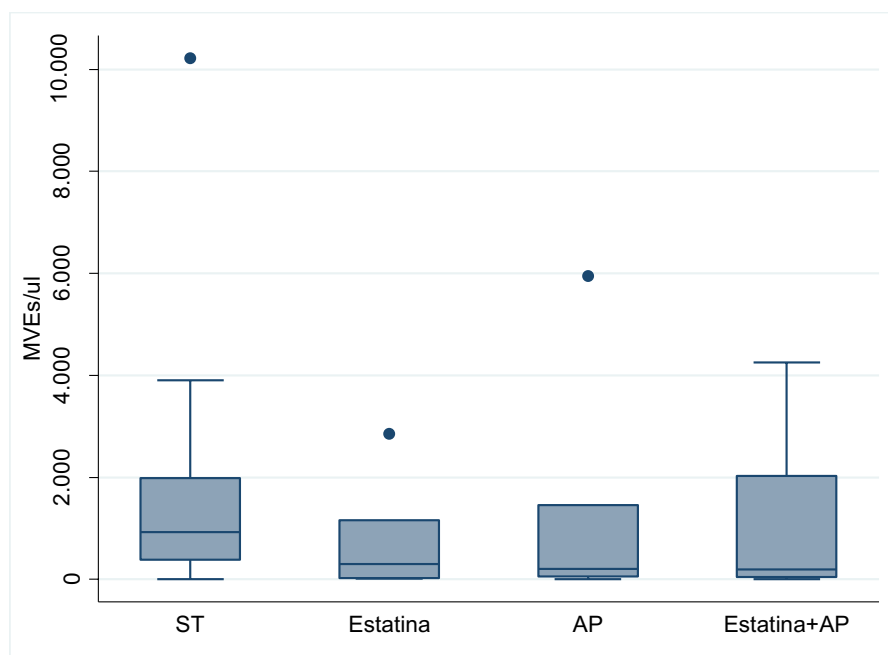
Debido a los datos obtenidos in vivo, respecto a los pacientes diabéticos con ERC no diálisis y la falta de n para realizar subanálisis, decidimos profundizar estos resultados realizando un estudio *in vitro*.

TABLA 11. Características basales de los pacientes en Hemodiálisis según su tratamiento recibido.

	Sin tratamiento	Estatinas	Antiagregantes plaquetarios	Estatina y antiagregantes plaquetarios	Total	p-valor
n	9	6	7	8	30	
Hombres (%)	33,3	16,7	57,1	37,5	36,7	0,50
Edad (Mediana [RIC])	70 [49-76]	77,5 [44-85]	74 [65-78]	63,8 [59-76]	71 [60-78]	0,81
Edad >50 años (%)	66,7	66,7	100,0	100,0	83,3	0,11
HTA (%)	100,0	66,7	71,4	100,0	86,7	0,11
DM (%)	44,4	0,0	71,4	87,5	53,3	0,008 *
Hiperuricemia (%)	11,1	16,7	14,3	12,5	13,3	0,99
Dislipemia (%)	22,2	33,3	42,9	75,0	43,3	0,16
Cardiopatía isquémica (%)	11,1	0,0	28,6	50,0	23,3	0,12
Insuficiencia cardíaca (%)	66,7	0,0	14,3	75,0	43,3	0,007 *
Arteriopatía periférica (%)	22,2	0,0	42,9	75,0	36,7	0,02 *
Enfermedad cerebro vascular (%)	0,0	0,0	14,3	50,0	16,7	0,02 *
Colesterol total mg/dl (Mediana [RIC])	147,0 [136,0-183,0]	155,0 [139,0-184,0]	157,0 [151,0-174,0]	142,5 [112,0-209,5]	152,0 [135,0-183,0]	0,99
Colesterol total >200 mg/dl (%)	11,1	16,7	14,3	25	16,7	0,89

HTA: hipertensión arterial; DM: diabetes mellitus; RIC: rango intercuartílico. Se consideran valores significativos con un valor $p < 0,05$ *

Figura 34. Niveles de MVEs en pacientes en tratamiento con estatinas y antiagregantes plaquetarios en pacientes en hemodiálisis.



En esta población no se mantiene el efecto reductor de las estatinas y los antiagregantes plaquetarios sobre los niveles séricos de MVEs. Los *outliers* se representan con puntos. MVEs: microvesículas endoteliales; ST: sin tratamiento; AP: antiagregantes plaquetarios.

5.4.4. Analizar *in vitro* el efecto de las Microvesículas de plasma de pacientes con nefropatía diabética sobre la célula endotelial

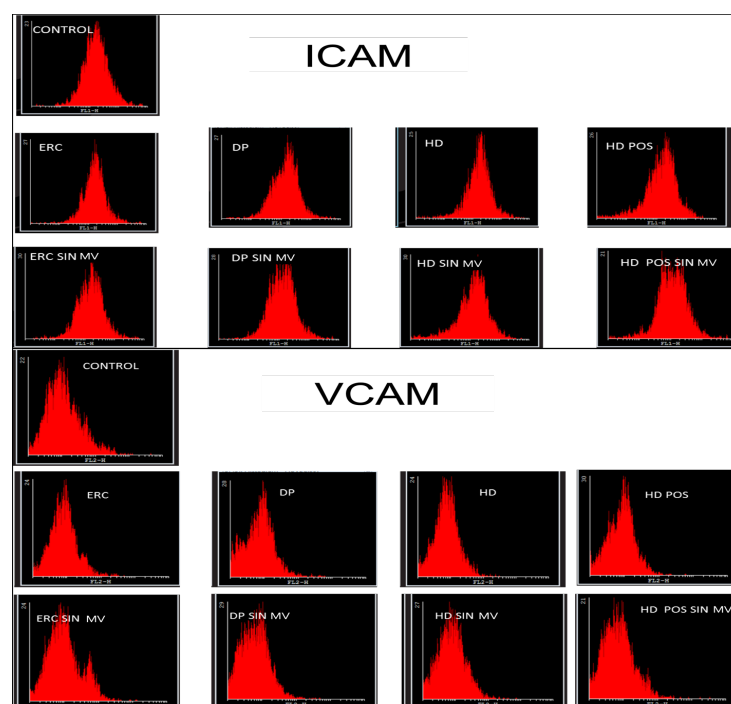
Hemos demostrado que la MVEs están elevadas en la ERC, en pacientes sin patología aguda presente, sin que parezca tener relación con otros marcadores de daño endotelial conocidos como los AOPP y el VEGF, al menos en situación de estabilidad clínica. Para evaluar la acción de las microvesículas en pacientes con enfermedad renal crónica a nivel de la célula endotelial, decidimos realizar un ensayo *in vitro*, utilizando pools de plasma de los distintos estadios de ERC, de etiología diabética.

El principal objetivo de este estudio es valorar si realmente las microvesículas forman una parte activa de la cascada del daño endotelial o son solo un biomarcador sin función efectora alguna.

5.4.5. Modelo *in vitro* del plasma de los pacientes con nefropatía diabética y moléculas de adhesión

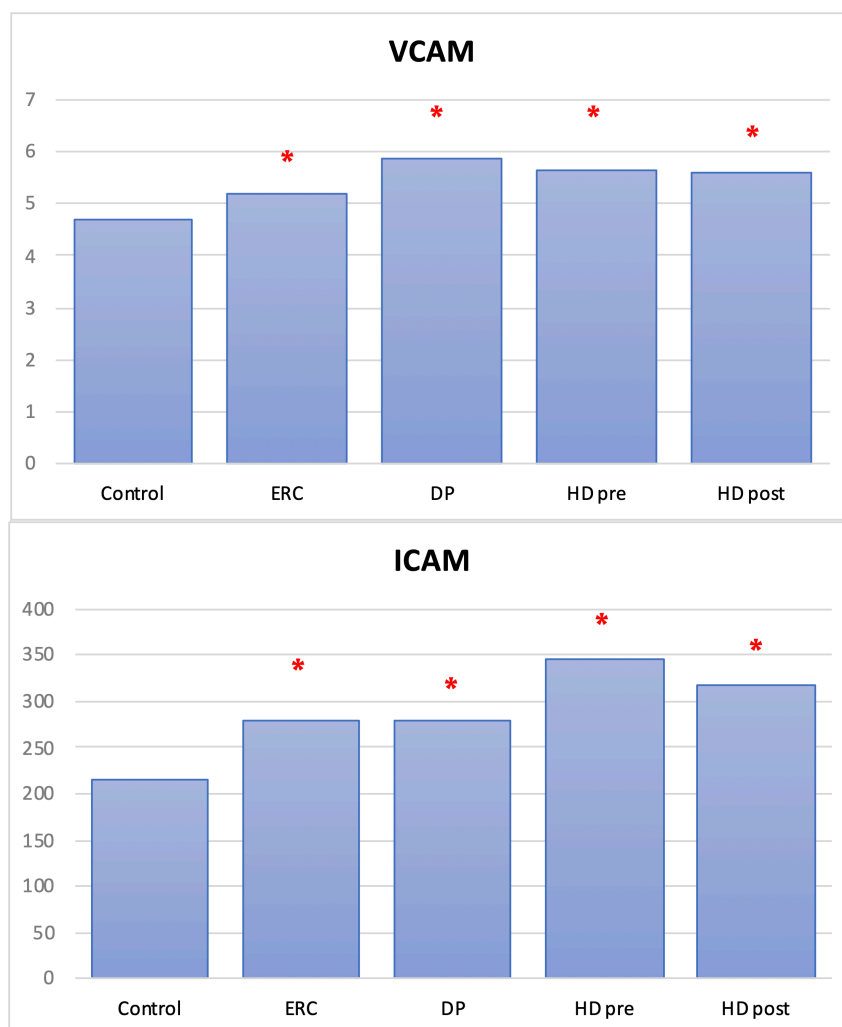
Se objetivó que pool de plasma, de los pacientes con ERC en todos los estadios de enfermedad renal, produjo un aumento en la expresión de ICAM y VCAM en las células HUVEC ($p < 0.006$) respecto a grupo control. Valores para ICAM: control 214,2 [213,8 – 221,3] vs ERC 280,1 [279,1 - 281,0] vs DP 280 [238,7 - 282,5] vs HD pre 345,6 [276,19 - 347] vs HD post 317,3 [244,5 – 322,3]. Valores para VCAM: Control 4,7 [4,6 - 4,9] vs ERC 5,18 [5,1 - 5,3] DP 5,85 [5,7 – 7,7] vs HD pre 5,63 [5,6 - 6,1] vs HD post 5,6 [5,5 - 6,6]. Estos valores se expresan en canal medio de fluorescencia (*Figura 35 y 36*). Al realizar el aislamiento de las microvesículas del plasma, objetivamos que las microvesículas no parecen tener efecto sobre VCAM, pero si sobre ICAM en los cultivos celulares disminuyendo la expresión de ICAM en todos los grupos, ERC 280,1 [279,1 - 281,0] vs ERC sin MV 320,5 [309,0 – 332,0], HD pre 345,6 [276,19 - 347] vs HD pre sin MV 352,0 [298,31 - 381], HD post 317,3 [244,5 – 322,3] vs HD post sin MV 324,4 [256,4 – 327,1], DP 280 [238,7 - 282,5] vs DP sin MV 311,1 [278,8 – 313,7] con una $p < 0,05$ (*Figura 37*).

Figura 35. Histogramas obtenidos por citometría de flujo para ICAM y VCAM en los diferentes grupos a estudio



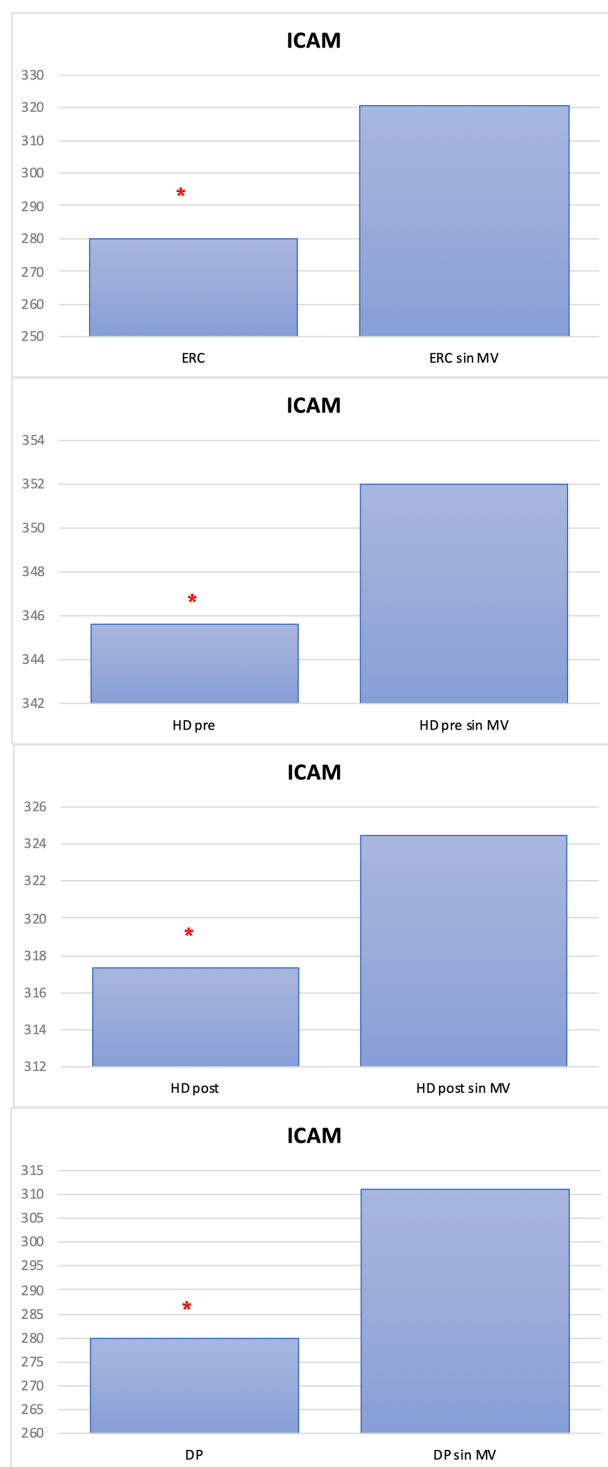
Los valores de ICAM y VCAM se expresan como canal medio de fluorescencia. ERC: enfermedad renal crónica, DP: diálisis peritoneal; HD: hemodiálisis. MV: microvesículas.

Figura 36. Valores de VCAM e ICAM obtenidos en los cultivos celulares al exponerlo a plasma de los diferentes estadios de ERC.



Los resultados son la mediana de 3 experimentos realizados en pocillos independientes y expresan el canal medio de fluorescencia que se encuentra en escala logarítmica. En todos los casos de ERC, DP y HD la expresión de VCAM e ICAM esta aumentada respecto al control. Los * expresan $p < 0,05$ vs a control. ERC: enfermedad renal crónica; DP: diálisis peritoneal; HD hemodiálisis; ICAM: molécula de adhesión de la célula vascular; VCAM: molécula de adhesión intercelular

Figura 37. Niveles de ICAM al exponerse a plasma de los diferentes estadios de ERC con y sin microvesículas.

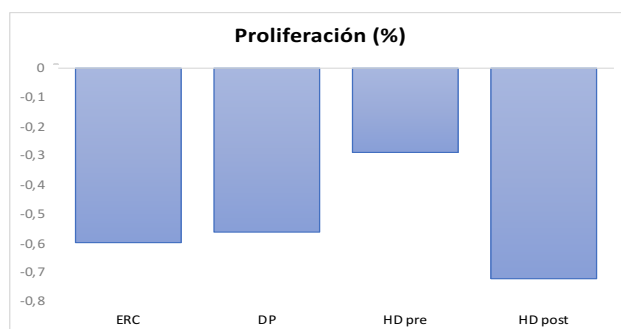


Los resultados son la mediana de 3 experimentos realizados en pocillos independientes y expresan el canal medio de fluorescencia que se encuentra en escala logarítmica. La presencia de microvesículas disminuye los valores de ICAM en todos los grupos. Los * expresan $p < 0,05$. MV: microvesículas; ERC: enfermedad renal crónica; DP: diálisis peritoneal; HD: hemodiálisis; ICAM: molécula de adhesión de la célula vascular.

5.4.6. Proliferación

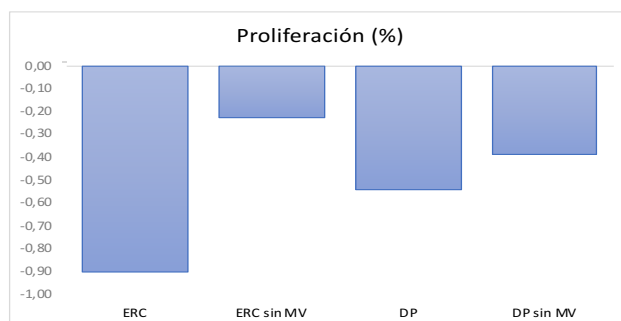
El plasma, de los pacientes con ERC en cualquier estadio, indujo una menor proliferación celular en los cultivos celulares HUVEC respecto al suero del grupo control: ERC - 0,6 % vs DP - 0,56 % vs HD pre - 0,29 % vs HD post - 0,72 %, a estos valores se les ha restado el control (*Figura 38*). Se objetivó una tendencia a menor proliferación con la presencia de microvesículas, tanto en los plasmas catalogados como ERC como los plasmas de diálisis peritoneal, ERC - 0,6 % vs ERC sin MV - 0,2 % y DP - 0,56 % vs -DP sin MV - 0,38 %, sin alcanzar la significación estadística (*Figura 39*). Sin embargo, en el grupo de hemodiálisis, las microvesículas no marcaron diferencia alguna.

Figura 38. Porcentaje de proliferación celular al exponerse a plasma de los diferentes estadios de ERC.



Los resultados son la mediana de 3 experimentos, a este porcentaje se le ha restado el control. La proliferación es menor en todos los grupos respecto al control. ERC: enfermedad renal crónica; HD: hemodiálisis; DP: diálisis peritoneal; MV: microvesículas.

Figura 39. Porcentaje de proliferación celular al exponerse a plasma con y libre de microvesículas.

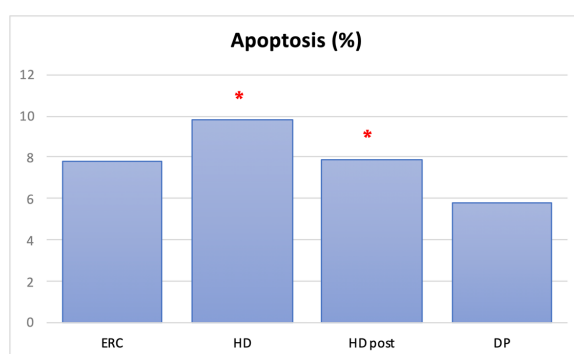


Los resultados son la mediana de 3 experimentos, a este porcentaje se le ha restado el control. Vemos la tendencia de menor proliferación en presencia de las microvesículas sin alcanzar la significación estadística. ERC: enfermedad renal crónica; DP: diálisis peritoneal; MV: microvesículas.

5.4.7. Apoptosis

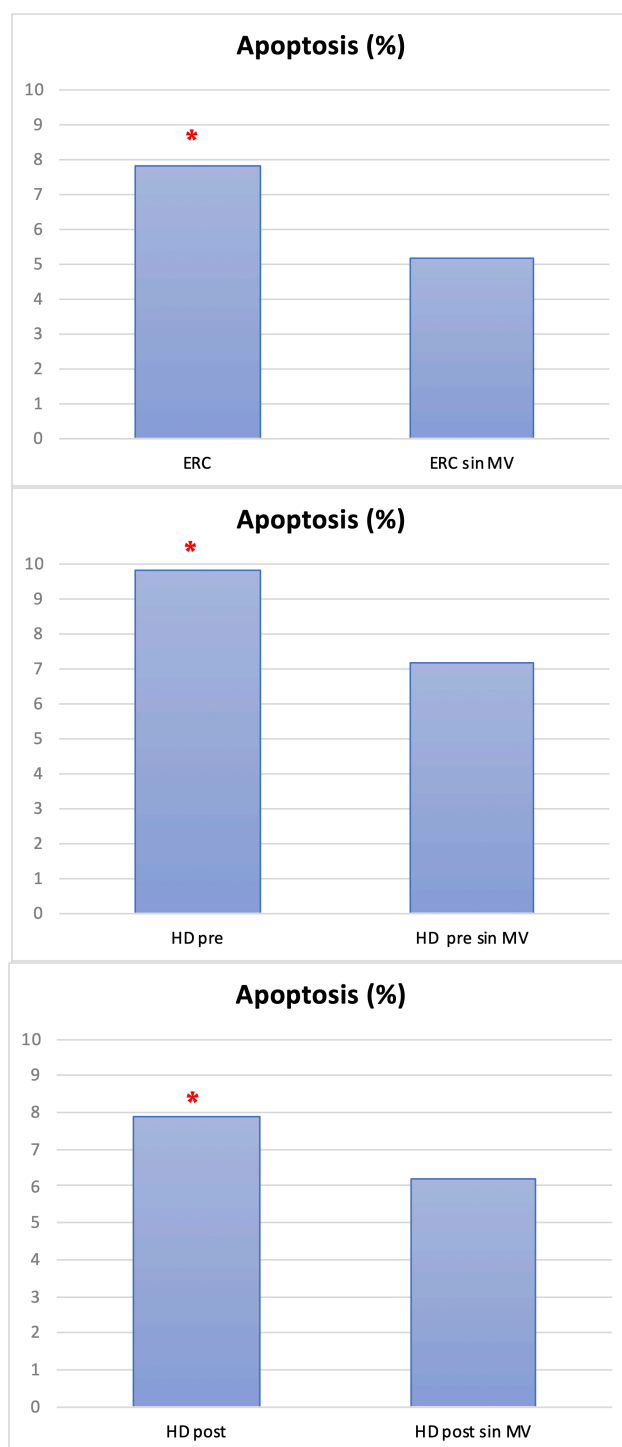
El plasma de pacientes con ERC indujo un aumento de la tasa de apoptosis en todos los grupos respecto al control, siendo los pools de HD tanto Pre como Post, 9,8 % y 7,9 % respectivamente, los que mayor tasa de apoptosis inducen respecto a ERC 7,8 % y diálisis peritoneal 5,8 % $p < 0,05$ (Figura 40). La presencia de microvesículas aumentó esta tasa de apoptosis en todos los grupos salvo en el de diálisis peritoneal, ERC 7,8 % vs ERC sin MV 5,14%; HD pre 9,8 % vs HD sin MV 7,15 % y HD post 7,9 % vs HD post sin MV 6,2 % con una $p < 0,05$ (Figura 41).

Figura 40. Porcentaje de apoptosis en los diferentes grupos.



A este porcentaje se le ha restado control. El grupo HD es el que más induce apoptosis respecto a los otros grupos, y el grupo HD post frente a DP, se representa con un * $p < 0,05$.
 ERC: enfermedad renal crónica; DP: diálisis peritoneal; HD: hemodiálisis; MV: microvesículas.

Figura 41. Porcentaje de apoptosis al exponerse a plasma con y libre de microvesículas.



A este porcentaje se le ha restado control. Podemos observar que la presencia de las microvesículas aumenta la apoptosis en todos los grupos excepto en diálisis peritoneal donde no hay diferencias significativas. * p 0,05. ERC: enfermedad renal crónica; HD: hemodiálisis; MV: microvesículas.

Discusión

Nuestro trabajo describe, por primera vez, que los pacientes con ERC presentan niveles elevados de MVEs circulantes, de forma similar a lo descrito en cardiópatas, sin tener una asociación lineal con la activación de VEGF y AOPPs. El perfil de comorbilidades variadas y factores como la edad, parecen influir en la producción de MVEs. La hemodiálisis no es capaz de revertir los niveles de MVEs a la normalidad, pero las estatinas y los antiagregantes plaquetarios parecen reducirlos, de forma independiente al efecto sobre los niveles de colesterol. El significado último de las MVEs, en la fisiopatología de la ERC, no ha podido ser aclarado completamente, pudiendo tener diferentes efectos en función de su composición.

Elevación de Microvesículas en la Enfermedad Renal Crónica

Estudios realizados en pacientes cardiológicos, identifican a las MVEs como un posible marcador de enfermedad cardiovascular, que se eleva desde estadios precoces¹²⁷. Sin embargo, hay pocos datos específicos en pacientes con ERC bien sea en diálisis o sin ella.

Los pacientes renales presentan mayor tasa de eventos cardiovasculares que la población con función renal conservada. El riesgo de sufrir un primer infarto en un paciente con ERC avanzada, es similar al riesgo de sufrir un reinfarto en un cardiópata con función renal normal. Es decir, la ERC actúa como un equivalente de evento cardiovascular^{47,152,153}. Es más, los registros de diálisis y trasplante señalan la patología vascular como primera causa de muerte¹⁵⁴. Por ello, el nuevo paradigma de la ERC, considera la afectación renal como un componente más de afectación vascular. Nuestros pacientes presentan una prevalencia creciente de diabetes mellitus, como nefropatía de base o como comorbilidad añadida, que llega a representar el 26% de los pacientes que inician tratamiento sustitutivo renal. De forma similar, la mayoría de los pacientes en diálisis son hipertensos y sólo un pequeño porcentaje presenta un ecocardiograma normal¹⁵⁴. La patología cardiovascular existe incluso en pacientes con ERC originada en nefropatías específicas como los cuadros glomerulares o intersticiales y no se requiere una causa primigenia vascular para generar un evento o muerte cardiovascular.

Muchos grupos de investigación intentamos desentrañar los múltiples procesos fisiopatológicos de integración riñón-endotelio-corazón. En los pacientes renales, se han descrito cambios estructurales y funcionales a nivel miocárdico y también sobre los distintos componentes de la pared arterial, como la rigidez de la media arterial, disfunción endotelial y una reducción de la producción del óxido nítrico^{155,156}. Todas

estas alteraciones, por si solas, no son capaces de explicar completamente los cambios que observamos en los pacientes con enfermedad renal. Por ello, necesitamos nuevas hipótesis que sustenten un modelo fisiopatológico integrado y más completo.

El interés en los últimos años de estudiar el comportamiento de las microvesículas, surge de la idea de que podrían actuar como un medio de comunicación de una célula a otra, a nivel local o incluso paracrino. Necesitamos comprender la información que transmiten, como se regulan y que acciones generan a distintos niveles celulares. Así, nos servirían como marcadores de riesgo y tal vez, podrían llegar a ser objeto de modificación, como dianas terapéuticas en procesos tanto fisiológicos como fisiopatológicos. El primer elemento de la investigación en MVEs es su cuantificación en sangre periférica, para después continuar estudiando su efecto como mediador en cultivos celulares. Por último, en un futuro, se podría evaluar su contenido y función tras intervenciones terapéuticas.

En este trabajo, hemos confirmado un incremento en los niveles circulantes de MVEs en pacientes con enfermedad renal, reforzando la visión integral de un endotelio afecto en nuestros pacientes, de forma similar a lo reportado previamente por cardiólogos. La explicación de este fenómeno no es aún completa. Hemos excluido a pacientes con alguna patología inflamatoria aguda reciente y seleccionado a aquellos con una baja incidencia de cardiopatía isquémica o arteriopatía periférica. Sin embargo, si estaban presentes otros factores de riesgos clásicos tradicionales como hipertensión arterial y diabetes. El hecho de que las MVEs estén elevadas en la enfermedad renal crónica, aún estando en fases muy estables de su enfermedad respecto a la población general, nos lleva a pensar que las MVEs son un marcador precoz, que puede estar presente incluso antes de que tengamos datos clínicos de disfunción endotelial establecida. No debemos olvidar que las MVEs, también se encuentran elevadas en una gran variedad de patologías como las enfermedades trombóticas, sepsis, diabetes, preeclampsia, así como en la enfermedad coronaria aguda.

Los experimentos de Amabile et al¹²³ demostraron que las MVEs de los pacientes con ERC disminuían la generación *in vitro* de óxido nítrico y afectaban la relajación en la pared arterial sana dependiente de óxido nítrico y guanósín monofosfato cíclico. Por ello, les atribuyen un papel más de agente efector, que de un simple biomarcador alternativo de daño endotelial en la enfermedad cardiovascular asociada a la enfermedad renal crónica. Esto implicaría la posibilidad de situar a las MVEs en la mira, como posibles dianas terapéuticas y así realizar una intervención precoz, antes de la activación de la cascada que conlleva a la inflamación crónica.

Los mecanismos que dan lugar al incremento de MVEs observado en los pacientes con ERC, son hasta el momento desconocidos, así como su interacción sobre la célula endotelial. Sabemos que las MVEs pueden estar presentes, tanto en procesos fisiológicos como patológicos, lo cual complica más aún su interpretación. Dentro de los mecanismos fisiopatológicos se incluyen: el estrés oxidativo, las citoquinas y los lipopolisacáridos endógenos¹²⁴.

A pesar de que muchos grupos de investigación abogan que las MVEs están presentes como agentes efectores en procesos de daño endotelial, la realidad es que no se ha llegado a un consenso sobre cual es el papel de las MVEs en el organismo. Mientras unos plantean un rol protagónico en procesos fisiopatológicos de daño, otros han propuesto la posibilidad de que actúen como agente protector dependiente de las condiciones de su liberación. Lo que sí está claro, es que su principal función es la de transmitir información de célula a célula formando una red de comunicación en el organismo y así intervenir directamente en la homeostasis del endotelio.

Es una realidad que, con los marcadores utilizados en la práctica clínica habitual, llegamos tarde y cuando logramos realizar el diagnóstico, el daño endotelial ya está establecido. Razón por la cual, la incidencia de eventos cardiovasculares en nuestra población de pacientes con ERC es elevada, a pesar del seguimiento estrecho realizado por los nefrólogos. Por ello, resulta prometedora la existencia de nuevos biomarcadores de daño vascular precoz en los pacientes renales.

Mecanismos de interacción entre Microvesículas endoteliales y otros mediadores

A nuestro grupo le ha parecido importante, además de valorar el comportamiento de las MVEs en la enfermedad renal crónica, corroborar si existe alguna asociación con otros marcadores ya de siempre conocidos como protagonistas en la disfunción endotelial en los enfermos renales.

Dentro de los marcadores clásicos, decidimos utilizar los AOPP, como forma de estimar estrés oxidativo, con una técnica de diagnóstico validada y ampliamente utilizada. Sabemos que los AOPP son un buen marcador de estrés oxidativo derivado de fagocitos, pero también son mediadores activos del estado inflamatorio asociado a la uremia, sin haberse descrito su relación con la MVEs en la enfermedad renal crónica. Sosteniendo la hipótesis de que las MVEs son marcadores de inflamación y de estrés oxidativo, con la posibilidad además de ser reguladores de la producción de ROS y

moduladores del tono vascular, decidimos testar si los AOPP podrían ser un paso intermedio del efecto de las MVEs sobre el estrés oxidativo.

Como era de esperar, observamos un aumento en el estado de estrés oxidativo estimado por las concentraciones circulantes de AOPP en pacientes con ERC y sobre todo en la población diabética. Sabemos que los AOPP podrían inducir fenómenos pro-inflamatorios en tejido renal y estar implicados en la génesis de la glomeruloesclerosis¹⁵⁷, formando parte del mecanismo del daño renal en la nefropatía diabética. De hecho, la administración intravenosa de AOPP en ratas diabéticas aumenta los AOPP en el riñón, promueve inflamación renal, hipertrofia glomerular, sobreexpresión de fibronectina y conduce a la albuminuria¹⁵⁸. No hemos encontrado una relación lineal entre los AOPP y las MVEs. Es más, tenemos datos muy discordantes para distintos perfiles de pacientes. Esto refleja probablemente la complejidad de nuestra investigación clínica sobre grupos de pacientes diferentes, con ERC de muy diversas causas, con distintas comorbilidades asociadas y con una amplia variedad de tratamientos. Este resultado es novedoso al no haber sido descrito previamente y apoya la teoría del efecto dual o paralelo de las microvesículas. Como se había comentado previamente, la función de las MVEs con respecto a los sistemas de generación de ROS no está claramente establecida aún.

El grupo de Mahmoud realizó un ensayo *in vitro* donde concluyen la posibilidad de un efecto paradójico de las MVEs, variando su efecto sobre la célula endotelial en función del ambiente en el que son liberadas. Así, en un modelo de estrés oxidativo inducido mediante ácidos grasos saturados libres, las MVEs podrían mejorar la expresión del factor relacionado con el factor nuclear eritroide-2, provocando una disminución de la producción de ROS y la peroxidación lipídica¹⁵⁹. Sin embargo, en condiciones de homeostasis, las MVEs disminuyen la generación de NO y aumentan la expresión de ROS, afectando a la relajación vascular dependiente de NO. Los autores interpretan este efecto dual, como un mecanismo de reparación que se pone en marcha en situaciones de lesión tisular. El efecto directo de las MVEs sobre el endotelio y el aumento o disminución de la producción de ROS, es hasta el momento una incógnita. La relación entre MVEs y marcadores de oxidación, como las AOPP, es compleja y está probablemente sometida a mecanismos de ajuste fino, complicando su interpretación al sufrir modificaciones a nivel circulante en estudios de diseño transversal como este.

La célula endotelial, en sujetos sanos, tiene múltiples funciones como: inducción de angiogénesis, reparación de herida y remodelado vascular; pero también cumple un rol importante en las enfermedades cardiovasculares con la formación de nuevos vasos, proceso en el cual el VEGF ha sido ampliamente estudiado. Se sabe que el VEGF es uno

de los principales mediadores de la angiogénesis y tiene potentes efectos de movilización en células endoteliales progenitoras.

La correlación del VEGF con las MVEs es muy controvertida en la bibliografía. El estudio, que hemos tomado como referencia para plantear la hipótesis de que las MVEs puedan liberar VEGF, es el realizado por el grupo de Fernández-Martínez et al¹⁵⁸. Ellos objetivaron en estudios experimentales, que las MVEs a una concentración mucho menor que la del plasma, aumentan la expresión de HIF- α / VEGF-A de una manera dependiente del receptor COX-2 / EP2 en las células tubulares proximales, implicándolas como posible agente efector del daño renal. Sin embargo, este modelo *in vitro* no se repite en nuestro análisis de correlación MVEs - VEGF circulantes, donde no hemos encontrado asociación entre los niveles de ambos biomarcadores. Datos similares se han obtenido en otros estudios realizados *in vivo*. Por ejemplo, en población con DM tipo 1 se ha descrito, tanto incremento de VEGF como marcador precoz de lesión renal como ausencia de correlación de los niveles de VEGF con la afectación microvascular, incluida la renal. Esto, probablemente esté en relación con que el VEGF y sus isoformas constituyen un sistema de señalización y estimulación de la angiogénesis, sintetizado por múltiples estirpes celulares, bajo el efecto de un amplio abanico de estímulos que abarcan a la hipoxia, la angiotensina II o la hiperglucemia¹⁶⁰. Nuevamente, es probable, que lo que ocurre a nivel tisular no sea trasladable a lo que reflejan los niveles circulantes de estas sustancias. La relación inversa, el VEGF como estimulación de la generación de MVEs, también se ha descrito *in vivo* e *in vitro*. De hecho, es conocido que los fármacos inhibidores del VEGF inducen cambios fenotípicos en las MVEs, promoviendo daño endotelial dependiente de la vía de Endotelina-1¹⁶¹. Sin embargo, el diseño de este estudio no ha permitido testar esta posibilidad en nuestra población.

Elevación de Microvesículas endoteliales y tratamientos en la Enfermedad Renal Crónica

Con las limitaciones de nuestro estudio, no hemos detectado una relación de las microvesículas con ninguno de los factores de riesgos cardiovasculares clásicos, ni así con los antecedentes de cardiopatía isquémica, accidente cerebrovascular o arteriopatía periférica. Debemos reconocer que la mayoría de los pacientes estaban en fases estable, siendo pocos los que tenían antecedentes relevantes, salvo en la población diabética, donde sí encontramos una disminución de las microvesículas. Estudios previos describen el efecto opuesto, con aumento de microvesículas en pacientes diabéticos. No obstante, al realizar el subanálisis hemos encontrado, que el uso de estatinas y antiagregantes

plaquetarios puede actuar como un factor de confusión muy importante en esta relación. Las guías actuales recomiendan instaurar precozmente estrategias de prevención primaria en pacientes diabéticos. Por ello, se les prescribe con frecuencia antiagregantes plaquetarios y estatinas, estableciendo objetivos de niveles de colesterol similares a los de la prevención secundaria.

Son pocos los estudios que analizan el impacto del tratamiento farmacológico sobre las MVEs. El papel de las estatinas, en la formación de las MVEs, ha sido testado previamente con resultados contradictorios. Diamant et al. afirmaban que en estudios *in vitro*, las estatinas estimulaban las MVEs¹⁶². Sin embargo, otro grupo afirmaba que la fluvastatina *in vitro* inhibía la liberación de MVEs. Probablemente, esto se deba a la complejidad de los mecanismos fisiopatológicos que envuelve todo este proceso y los efectos de factores de confusión como la edad, el sexo y la comorbilidad asociada. Así como, la falta de un consenso sobre una metodología unívoca para procesar, preservar y analizar las MVEs.

El ensayo clínico de la protección cardíaca y renal (SHARP), demostró que la terapia con estatinas modifica los eventos ateroscleróticos en pacientes con ERC, independientemente de los niveles séricos de colesterol total¹⁶³, sugiriendo un efecto pleiotrópico de estos fármacos. También se ha estudiado en pacientes con miocardiopatía isquémica, independientemente de los niveles de colesterol total y sus fracciones¹⁶⁴, que la estatina disminuye los niveles de MVEs.

Estudios *in vitro*, realizados por nuestro grupo (datos no publicados), han demostrado previamente que la adición de atorvastatina disminuye la producción de las especies reactivas de oxígeno (ROS) inducidas por el indoxil sulfato, en las células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVEC), apoyando la hipótesis previa de la existencia de efectos pleiotrópicos de las estatinas sobre las células endoteliales^{165,166}. Los resultados aquí presentados, plantean la posible existencia de otros mecanismos pleiotrópicos de la estatina sobre la pared vascular, en este caso mediado por las MVEs.

Nosotros hemos demostrado que el descenso de las MVEs es independiente de los niveles de colesterol total. La justificación para este efecto está basada en la hipótesis que plantea el grupo de Tramontado et al. los cuales refieren que existe un vínculo entre las estatinas, la vía Rho / ROK y la regulación de la liberación de MVEs¹⁶⁷.

La Vía Rho/rho-cinasa es la responsable de la iniciación y progresión de la aterosclerosis en vasculopatías hipertensivas. Al inhibir la isoprenilación, la proteína Rho evita que se una a la membrana de las proteínas Rho, con posterior activación de la Rho-cinasa¹⁶⁸. En la célula endotelial, la familia Rho guanosina trifosfatasa (pequeñas GTPasas) son reguladores clave tanto de la adhesión celular, como del citoesqueleto¹⁶⁹. También es responsable en procesos de proliferación, apoptosis y de adhesión celular^{170,171}.

Los fármacos antiagregantes plaquetarios, también han demostrado modificar la cantidad de MVEs circulantes en varios escenarios clínicos y experimentales¹⁷². En este sentido, Bulut et al¹⁷³ demostraron que el tratamiento con ácido acetilsalicílico reduce el número de MVEs circulantes, en pacientes con enfermedad coronaria aguda, por un mecanismo desconocido. Somos los primeros en demostrar, que los antiagregantes plaquetarios en pacientes con enfermedad renal crónica, tienen menores niveles de MVEs circulantes, aunque debemos reconocer que nuestra mayor limitación es el tamaño muestral. Es conocido que la aspirina mejora la función endotelial vascular, por mecanismos independientes de la Ciclooxygenasa¹⁷⁴ y es discutible si esto podría ejercer efectos cardioprotectores adicionales más allá de los atribuidos a la actividad antitrombótica. Puesto que las MVEs pueden inducir directamente disfunción endotelial, el efecto reductor de la aspirina sobre las MVEs circulantes, podría explicar el mecanismo de protección endotelial de este fármaco.

En nuestra serie, hemos reportado una tendencia, en los pacientes tratados con agentes antiplaquetarios y estatinas, a la disminución de los niveles séricos de VEGF, sin correlación con los niveles de MVEs. La interpretación de este resultado es compleja y escapa al diseño de este estudio. Por ello, en este estudio no podemos aclarar si ambos fenómenos están relacionados o son mecanismos fisiopatológicos independientes.

Asociación entre comorbilidad y edad con Microvesículas endoteliales

No existe un consenso sobre la cantidad considerada como normal, en el tamaño ni composición de las MVEs en la población sin comorbilidad asociada y joven. Nuestros hallazgos sugieren que la edad se asocia con disminución de los niveles de MVEs, algo que no lo esperábamos encontrar cuando diseñamos el estudio y obtuvimos la financiación del ISC III (PI 14/00806) para iniciarlo. Dado que la ERC se asocia a senescencia precoz, es de esperarse que este envejecimiento acelerado aumente la disfunción endotelial y por lo tanto aumenten los niveles de MVEs. Resultados similares

se han descrito previamente por Anne Forest et al y el grupo de Erez Eitan, aunque no en personas con enfermedad renal crónica como tal. Este último sostiene la hipótesis de que las vesículas extracelulares disminuyen con la edad, por aumento de su internalización en los leucocitos¹⁷⁵ o que sencillamente, estos niveles bajos de vesículas extracelulares podrían reflejar una desaceleración del proceso de recambio, debido a un endotelio senescente con menor metabolismo y actividad celular¹⁷⁶. Con este resultado podemos sugerir la importancia de investigar los cambios de las MVEs con la edad, tanto en su número, tamaño y composición, que podrían ser consecuencia de una alteración en este importante sistema de comunicación o cambios fenotípicos celulares asociados a la senescencia celular. Al analizar el efecto del tratamiento estratificando por edad, observamos que el uso de estatinas y los antiagregantes plaquetarios guarda correlación con la disminución de los niveles de MVEs, siendo significativo en el segundo tercil.

Es importante recalcar, que no existe relación entre el estadio de enfermedad renal crónica y los niveles de microvesículas endoteliales, a pesar de la hipótesis previa de que el incremento de las microvesículas en este grupo de pacientes es dependiente de los daños asociados a la enfermedad renal crónica, guardando una relación lineal con el filtrado glomerular. Este resultado refleja la complejidad de la ERC y sus mecanismos fisiopatológicos de daño vascular. A diferencia de los estudios realizados en enfermedad coronaria, donde las MVEs son marcadores pronósticos de riesgo vascular, en nuestra población parecen elevarse por múltiples factores, restándole utilidad como un marcador asociado a la progresión de enfermedad renal y al riesgo vascular. Así, es imperativo hacer una evaluación exhaustiva sobre la actividad de las MVEs, en diferentes estadios de enfermedades renal y analizar su significado.

Un hallazgo que nos ha llamado la atención, es que a mayor índice de masa corporal menor nivel de MVEs, lo que no había sido descrito previamente en pacientes con ERC. Los estudios realizados respecto a la obesidad y microvesículas en la población general relacionan a la obesidad mórbida con un elevado nivel de MVEs y con el síndrome metabólico¹⁷⁷. Es posible que el efecto del sobrepeso sobre las MVEs desaparezca en presencia de uremia, siendo más determinante el FG sobre el nivel de MVEs que el IMC. No obstante, necesitamos más estudios para entender mejor el comportamiento de las MVEs y su relación con el IMC, en la población con enfermedad renal.

Sabemos que las MVEs se elevan en la enfermedad renal crónica, pero no parece tener una correlación con los diferentes estadios de esta enfermedad. No encontramos una relación con las AOPP ni con el VEGF, pero nos parecía imprescindible verificar si esta elevación de las MVEs era dependiente o no de la uremia y si al corregir este estado de inflamación crónica, las estatinas y los antiagregantes plaquetarios, mantienen su efecto. Por ello, quisimos analizar las MVEs en pacientes en programa de hemodiálisis crónica.

El papel de la Hemodiálisis en las Microvesículas endoteliales

La hemodiálisis es la terapia sustitutiva renal más frecuentemente utilizada. Han sido múltiples los avances, tanto en máquinas, como en dializadores y líquidos utilizados logrando que en la actualidad dispongamos cada vez de más herramientas, que minimizan la alteración de la homeóstasis durante las sesiones de diálisis.

En nuestra población estudiada, objetivamos un aumento de MVEs respecto al grupo control y respecto a ERC, aunque sin alcanzar la significación estadística respecto a esta última. Notamos una mayor dispersión de la muestra, probablemente secundario a múltiples factores asociados, como son entre otros, el tipo de técnica de diálisis, el acceso vascular, la función renal residual lo que hace que estudiar a esta población sea de gran complejidad. Tal vez, podría ser esta la razón del hallazgo de algunos datos contradictorios. Algunos autores afirman que las MVEs disminuyen por adsorción durante la sesión de hemodiálisis¹⁷⁸, mientras que otros aseguran que hay un aumento de las mismas debido a un aumento del estrés oxidativo y hemodinámico al que es sometido el paciente durante la hemodiálisis¹⁷⁹. Como se mencionó previamente, el poro de las membranas utilizadas en la actualidad es mucho menor que el tamaño de las microvesículas, así que podemos afirmar que la hemodiálisis no depura las MVEs, aunque si parece alterar sus valores, dado que los pacientes no mantienen sus valores iniciales a la técnica y en algunos incluso llegan a aumentar, por mecanismos aún por determinar. También será de gran interés, analizar el comportamiento de las MVEs durante las sesiones de hemodiálisis y valorar su utilidad como un biomarcador precoz o como un mero factor de confusión, en pacientes en tratamiento con hemodiálisis.

Respecto a los fármacos, las estatinas y los antiagregantes plaquetarios, no parecen mantener su efecto protector en los pacientes con ERC 5D, aunque no disponemos de ensayos clínicos bien diseñados que incluyan a este tipo de pacientes y que contesten de forma rotunda esta cuestión. Como sabemos, las guías actuales sobre

dislipemia en pacientes en HD, no aconsejan el inicio de una estatina y proponen la estrategia denominada “*fire and forget*” en aquellos pacientes en los que el tratamiento se ha iniciado precozmente¹⁵². Como mencionábamos antes, esto se debe a la ausencia de evidencia del beneficio de las estatinas, en este grupo de pacientes, basada en ensayos clínicos. En este sentido, un metaanálisis de pacientes con ERC, describió que el efecto beneficioso de la estatina desaparecía al avanzar el estadio de la enfermedad renal¹⁸⁰.

En la población estudiada con ERC, es de interés recalcar el bajo porcentaje de diabéticos sin tratamiento (estatina o antiagregantes plaquetarios). La disminución de MVEs circulantes que nosotros observamos en nuestra población diabética, no concuerda con análisis reportados previamente acerca de una asociación entre la diabetes mellitus y las complicaciones micro y macro vasculares, con un incremento de las MVEs¹⁸¹. Esta discordancia podría estar en relación con el efecto del tratamiento con estatina y antiagregantes plaquetarios, pero dado que apenas hemos encontrado pacientes diabéticos sin tratamiento (estatina o antiagregantes plaquetarios) en nuestra muestra, no pudimos profundizar más en este aspecto.

Estudio *in vitro* de las Microvesículas

Para finalizar este trabajo, decidimos realizar un experimento *in vitro*, solo con pool de pacientes diabéticos y analizando si las microvesículas actúan como un agente efector y no solo como un marcador de daño endotelial.

Como era de esperar, el plasma de los pacientes con nefropatía diabética induce cambios inflamatorios y modificación en la proliferación y apoptosis del endotelio, demostrando que las microvesículas de los pacientes con enfermedad renal crónica inducen cambios en el endotelio.

Las microvesículas no parecen tener acción sobre el VCAM, pero si sobre el ICAM, aunque estos datos estarían a favor de un efecto protector a nivel de la célula endotelial, al disminuir la liberación de ICAM en presencia de plasma con microvesículas. Trabajos *in vitro* realizados previamente, aunque no con plasma urémico, han demostrado que la regulación de la expresión de ICAM por las MVs depende del contenido en el microRNA-222 y se transfiere a su célula objetivo¹⁸². El grupo de Jansen proponen a las MVEs como un agente protector que modula la inflamación a nivel del endotelio, protegiendo a la célula endotelial de la apoptosis inducida por camptotecina, a través de la inhibición de

la activación de p38 y la restauración de la expresión de MKP-1. No obstante, cada vez son más los autores que abogan por un papel dual en los mecanismos de reparación endotelial, dejando la puerta abierta a un posible efecto protector de la de MVEs, dependiendo de su composición así como del entorno en el cual han sido liberadas⁹⁵. Los primeros en argumentar el efecto antiinflamatorio de las microvesículas fueron Gasser y Schifferli, que objetivaron este efecto de la microvesículas en los estadios tempranos de la sepsis¹⁸³.

Las microvesículas son unas estructuras complejas y todavía nos queda mucho por aprender de ellas y su comportamiento. Sabemos que tienen un papel en la inflamación, trombosis y la angiogénesis, pero dependiente del entorno en donde se hayan liberado pueden ayudar a mantener la homeostasis vascular. Actualmente, sabemos que las microvesículas tienen la capacidad promover la angiogénesis, lo que nos orienta a como pueden ejercer su posible efector protector a nivel vascular. Sin embargo, volvemos a recalcar que es tan importante la célula parental como el ambiente en el que las MVE son liberadas, dado que una acción angiogénica en células tumorales sería un efecto contraproducente a diferencia de si este efecto se realiza en órganos hipoperfundidos como ocurre en las situaciones de isquemia.

A nivel de la célula endotelial, en nuestros experimentos *in vitro*, vemos como las microvesículas aumentan la apoptosis y disminuyen la proliferación celular apoyando la teoría de que son agentes efectores y no solo un biomarcador. Asegurar que la elevación de las MVEs, por si sola, es un marcador de mal pronóstico no sería lo más adecuado, sobre todo teniendo en cuenta todo lo anteriormente descrito.

A las microvesículas desde su descubrimiento se les ha dado el papel protagónico en situaciones fisiopatológicas y con los resultados encontrados en nuestros experimentos nos unimos a apoyar la hipótesis de un efecto dual. Cada vez son más los grupos de investigación que apoyan esta línea, en el cual las microvesículas según el ambiente en el que se han liberado pueden inducir un efecto protector o todo lo contrario. Creemos que tal vez en condiciones de estrés buscan mantener la homeóstasis en el endotelio y al mismo tiempo podrían ser potencialmente patógenos dependiendo de su entorno.

Aunque a día de hoy las microvesículas están lejos de ser un marcador “gold estándar” para el diagnóstico de riesgo cardiovascular, es una realidad que cada día hay más evidencia de su protagonismo en diversas patologías. Seguir investigando su

comportamiento y composición nos ayudará a entender muchos procesos fisiológicos, así como fisiopatológicos.

Todavía nos quedan por aclarar muchas incógnitas, como cuales son los mecanismos de regulación de las microvesículas y cual es el estímulo para comportarse de una manera u otra en el endotelio vascular. Sabemos que es primordial centrarnos en analizar su contenido y su comportamiento, no solo de manera puntual si no como agente efector en múltiples patologías. Observar su comportamiento en distintos ambientes y situaciones nos conducirá a entenderlas mejor y dejar de verlas como un mero marcador pronóstico, si no como un agente efector que se ve alterado o regulado por diferentes estímulos.

Limitaciones

Este trabajo de Tesis Doctoral tiene algunas limitaciones. El grupo control está formado por sujetos sanos, de edades no pareadas con las de la población a estudio y sin comorbilidad asociada. No obstante, resulta imprescindible incluir estos resultados, dada la ausencia de valores de referencia de normalidad para estos factores. A esto se la suma la variabilidad de las medidas efectuadas, dado que muchas no son medidas convencionales.

En la actualidad, la citometría de flujo es la mejor técnica para medir las microvesículas, pero es una técnica complicada que debe ser utilizada por personal con experiencia para evitar pérdidas de eventos. Para intentar minimizar este posible error, utilizamos rectas patrón interensayo que permiten homogeneizar resultados, determinamos cada muestra por triplicado y utilizamos la media de las determinaciones.

Líneas de futuro

La alta tasa de eventos cardiovasculares, en la población con ERC, hace que sea importante el descubrimiento de nuevos biomarcadores que nos permitan actuar precozmente sobre el daño endotelial. En este sentido, planeamos proseguir la línea de estudio aquí iniciada, incluyendo el seguimiento de pacientes en distintos estadios de enfermedad renal y con diferentes tipos de intervención terapéutica, para seguir analizando el modo en que se comportan las MVEs y su relación con distintos biomarcadores de inflamación y oxidación. Las MVEs actúan como agentes efectores que transfieren moléculas bioactivas a receptores adyacentes y distantes, por lo que

planteamos como continuación de este proyecto la determinación de la composición de las MVEs liberadas en la ERC y su contenido microRNA. Específicamente se plantea estudiar marcadores de procesos inflamatorios como el miRNA 126, que está estrechamente relacionado con la actividad angiogénica y vasculogénica, disminuyendo su expresión en células endoteliales senescentes¹⁸⁴, los relacionados con el estrés oxidativo como el miRNA 34, miRNA 335, miRNA 21 y los implicados en la calcificación vascular como el miRNA 143, miRNA 145. Esta línea de trabajo permitiría valorar el uso de MVEs genéticamente modificados, con la intención de descubrir nuevas herramientas terapéuticas. Este proyecto ha sido presentado por nuestro grupo y fue aprobado para financiación por el ISC III para los años 2019-22 (PI18/001568).

Conclusiones

1. *Los pacientes con enfermedad renal crónica expresan niveles circulantes elevados de microvesículas endoteliales y una tendencia al aumento de AOPP como reflejo de afectación endotelial, intentando mantener las homeostasis, a través de una red de comunicación que activa los posibles mediadores implicados en la reparación endotelial.*
2. *No existe relación directa entre los niveles de microvesículas endoteliales y los valores de VEGF y AOPP, apoyando la hipótesis de que estas funcionan como una primera llamada a nivel del endotelio.*
3. *La edad parece ser determinante en el número de microvesículas endoteliales de los pacientes con nefropatía, aunque se precisan más estudios para conocer si existe una alteración cualitativa añadida.*
4. *No se ha objetivado una asociación de los niveles de microvesículas endoteliales y los marcadores inflamatorios de uso habitual en clínica.*
5. *La hemodiálisis no revierte la activación de las microvesículas endoteliales, a pesar de corregir parcialmente la uremia, por lo que parecen asociarse más a la activación endotelial que a la toxicidad urémica per se.*
6. *Las estatinas y los antiagregantes plaquetarios utilizados en enfermedad renal crónica, se asocian a una reducción de los niveles de microvesículas endoteliales circulantes, casi hasta valores propios de la población con función renal conservada, apoyando su posible papel pleiotrópico en el restablecimiento de la homeóstasis del endotelio.*

7. *Las estatinas y los antiagregantes plaquetarios no mantienen este efecto protector en pacientes en hemodiálisis y no reducen los niveles de microvesículas endoteliales.*
8. *La población diabética expresa menos microvesículas endoteliales, probablemente debido al efecto protector de los fármacos utilizados para reducir el riesgo cardiovascular, aunque la falta de potencia estadística de nuestro estudio no ha permitido separar ambos factores.*
9. *En nuestro análisis “in vitro”, el plasma de los pacientes con enfermedad renal asociada a diabetes, disminuye la proliferación celular, aumenta la apoptosis del endotelio y potencia la activación de moléculas de adhesión.*
10. *Las microvesículas intervienen en los mecanismos de disminución de la proliferación celular y aumento de la apoptosis endotelial, apoyando la hipótesis de su capacidad como agente efector.*
11. *La enfermedad renal crónica aumenta la liberación de microvesículas en respuesta al daño endotelial precoz, pudiendo ser efectores de daño o reparación endotelial, por lo que sería necesario determinar su composición para resolver esta aparente contradicción.*

Bibliografía

1. Martínez-Castelao A, Górriz-Teruel JL, Bover-Sanjuán J, Segura-de la Morena J, Cebollada J, Escalada J, et al. Documento de consenso para la detección y manejo de la enfermedad renal crónica. *Aten Primaria* [Internet]. 2014;46(9):501–19. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24658201>
2. Levin A, Stevens PE, Bilous RW, Coresh J, De Francisco ALM, De Jong PE, et al. Kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) CKD work group. KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease. *Kidney International Supplements*. 2013.
3. Wouters OJ, O'Donoghue DJ, Ritchie J, Kanavos PG, Narva AS. Early chronic kidney disease: Diagnosis, management and models of care. *Nat Rev Nephrol*. 2015;11(8):491–502.
4. James MT, Hemmelgarn BR, Tonelli M. Early recognition and prevention of chronic kidney disease. *Lancet*. 2010;75(9722):1296–309.
5. Otero A, de Francisco A, Gayoso P, García F. On behalf of the EPIRCE Study Group. Prevalence of chronic renal disease in Spain: results of the EPIRCE study. *Nefrología*. 2010;30(1):78–86.
6. Guallar-Castillón P, Francisco Péreza R, López García E, León-Muñoz LM, Aguilera MT, Graciani A, et al. Magnitud y manejo del síndrome metabólico en España en 2008-2010: Estudio ENRICA. 2014;67(5):367–73.
7. Ortiz A, Sanchez-Niño MD, Crespo-Barrio M, De-Sequera-Ortiz P, Fernández-Giráldez E, García-Maset R, et al. The Spanish Society of Nephrology (SENEFRO) commentary to the Spain GBD 2016 report: Keeping chronic kidney disease out of sight of health authorities will only magnify the problem. *Nefrología*. 2019;39(1):29–34.
8. Sociedad Española de Nefrología. La Enfermedad Renal Crónica en España 2018 [Internet]. Sen. 2018. Available from: http://www.senefro.org/contents/webstructure/comunicacion/SEN_dossier_Enfermedad_Renal_Cro.pdf
9. Vargas Marcos F, Remón Rodríguez C, Sánchez Miret JI, Díaz Corte C, Cortés Sancho R. Documento Marco sobre Enfermedad Renal Crónica dentro de la Estrategia de Abordaje a la Cronicidad en el SNS [Internet]. Ministerio De Sanidad Servicios Sociales E Igualdad. 2015. 1–54 p. Available from: http://www.senefro.org/modules/news/images/enfermedad_renal_cronica_2015.pdf
10. López-Sánchez P, Portolés J, Martín Rodríguez L, Tornero F, Ramos Martín-Vegue AJ, Herrero JA, et al. Impacto del primer año de tratamiento sustitutivo renal en la hospitalización de una comunidad autónoma. *Nefrología*. 2019;39(6):653–63.
11. García de Vinuesa S. Factores de progresión de la enfermedad renal crónica . Prevención secundaria. *Nefrología*. 2008;28(Suppl 3):17–21.
12. Stevens LA, Coresh J, Greene T, Levey AS. Assessing Kidney Function — Measured and Estimated Glomerular Filtration Rate. *N Engl J Med*. 2006;354(23):2473–83.
13. National Kidney Foundation. K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*. 2002;39(2 Suppl 1):S1-266.
14. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y, Castro III AF, Feldman HI, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med*. 2009;50(9):604-612.

15. Gracia-Garcia S, Montanes-Bermudez R, Morales-Garcia LJ, Diez-de Los Rios MJ, Jimenez-Garcia JA, Macias-Blanco C, et al. Current use of equations for estimating glomerular filtration rate in Spanish laboratories. *Nefrologia*. 2012;32(4).
16. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang YL, Castro AF, Feldman HI, et al. CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration). A new equation to estimate glomerular filtration rate. *Ann Intern Med*. 2009;
17. Stevens LA, Schmid CH, Greene T, Zhang Y, Beck GJ, Froissart M, et al. Comparative performance of the CKD Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) and the Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Study equations for estimating GFR levels above 60 mL/min/1.73 m². *Am J Kidney Dis*. 2010;56(3):486-495.
18. Peralta CA, Shlipak MG, Judd S, Cushman M, McClellan W, Zakai NA, et al. Detection of chronic kidney disease with creatinine, cystatin c, and urine albumin-to-creatinine ratio and association with progression to end-stage renal disease and mortality. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2011;305(15):1545-52.
19. Cockcroft DW, Gault MH. Prediction of creatinine clearance from serum creatinine. *Nephron*. 1976;16(1):31-41.
20. Inker LA, Astor BC, Fox CH, Isakova T, Lash JP, Peralta CA, et al. KDOQI US commentary on the 2012 KDIGO clinical practice guideline for the evaluation and management of CKD. *Am J Kidney Dis*. 2014;63(5):713-35.
21. Gorostidi M, Santamaría R, Alcázar R, Fernández-Fresnedo G, Galcerán JM, Goicoechea M, et al. Spanish Society of Nephrology document on KDIGO guidelines for the assessment and treatment of chronic kidney disease. *Nefrología*. 2014;34(3):302-16.
22. Tangri N, Stevens LA, Griffith J, Tighiouart H, Djurdjev O, Naimark D, et al. A predictive model for progression of chronic kidney disease to kidney failure. *JAMA - J Am Med Assoc*. 2011;305(15):1553-1559.
23. Robinson BE. Epidemiology of Chronic Kidney Disease and Anemia. *J Am Med Dir Assoc*. 2006;7((9 Suppl)):S3-6; quiz S17-21.
24. Spinowitz B, Pecoits-Filho R, Winkelmayr WC, Pergola PE, Rochette S, Thompson-Leduc P, et al. Economic and quality of life burden of anemia on patients with CKD on dialysis: a systematic review. *J Med Econ*. 2019;22(6):593-604.
25. Weiner DE, Tighiouart H, Vlagopoulos PT, Griffith JL, Salem DN, Levey AS, et al. Effects of anemia and left ventricular hypertrophy on cardiovascular disease in patients with chronic kidney disease. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16(6):1803-1810.
26. Locatelli F, Bárány P, Covic A, De Francisco A, Del Vecchio L, Goldsmith D, et al. Kidney Disease: Improving Global Outcomes guidelines on anaemia management in chronic kidney disease: A European Renal Best Practice position statement. *Nephrol Dial Transplant*. 2013;28(6):1346-59.
27. Locatelli F, Aljama P, Canaud B, Covic A, De Francisco A, Macdougall IC, et al. Target haemoglobin to aim for with erythropoiesis-stimulating agents: a position statement by ERBP following publication of the Trial to reduce cardiovascular events with Aranesp therapy (TREAT) study. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(9):2846-50.
28. Mejía N, Roman-García P, Miar AB, Tavira B, Cannata-Andía JB. Chronic kidney disease--mineral and bone disorder: a complex scenario. *Nefrologia*. 2011;31(5):514-9.
29. Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO) CKD-MBD Update Work

- Group (2017). KDIGO 2017 Clinical Practice Guideline Update for the Diagnosis, Evaluation, Prevention, and Treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* [Internet]. 2017;7(1):1–59. Available from: <http://kdigo.org/wp-content/uploads/2017/02/2017-KDIGO-CKD-MBD-GL-Update.pdf%0Ahttp://www.nature.com/ki/journal/v76/n113s/index.html>
30. Moe SM. Vascular calcification and renal osteodystrophy relationship in chronic kidney disease. *Eur J Clin Invest*. 2006;36 Suppl 2:51–62.
 31. Kendrick J, Chonchol M. The role of phosphorus in the development and progression of vascular calcification. *Am J Kidney Dis*. 2011;58(5):826–34.
 32. Barril-Cuadrado G, Puchulu MB, Sánchez-Tomero JA. Table showing dietary phosphorus/protein ratio for the Spanish population. Usefulness in chronic kidney disease. *Nefrologia*. 2013;33(3):362–71.
 33. Rosansky SJ, Eggers P, Jackson K, Glasscock R, Clark WF. Early start of hemodialysis may be harmful. *Arch Intern Med*. 2011;171(5):396–403.
 34. Rosansky S, Glasscock RJ, Clark WF. Early start of dialysis: A critical review. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2011;6(5):1222–8.
 35. Cooper BA, Branley P, Bulfone L, Collins JF, Craig JC, Fraenkel MB, et al. A Randomized, Controlled Trial of Early versus Late Initiation of Dialysis. *N Engl J Med* [Internet]. 2010 Aug 12;363(7):609–19. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa1000552>
 36. Kalantar-Zadeh K, Unruh M, Zager PG, Kovesdy CP, Bargman JM, Chen J, et al. Twice-weekly and incremental hemodialysis treatment for initiation of kidney replacement therapy. *Am J Kidney Dis*. 2014;64(2):181–6.
 37. Fernández Lucas M, Teruel JL. Hemodiálisis incremental como forma de inicio del tratamiento sustitutivo renal. *Nefrología*. 2016;37(1):1–4.
 38. Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JFE. Chronic kidney disease: Effects on the cardiovascular system. *Circulation*. 2007;116(1):85–97.
 39. Maqueda IG, Rodríguez CC, Cervantes CE, García A, Moral JRP, Prieto E, et al. Enfermedad cardiovascular y función renal . Mecanismos patogénicos. *Rev Esp Cardiol Supl*. 2008;10E-21E.
 40. Dawber TR, Meadors GF, Moore FE. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health*. 1951;41(3):279–81.
 41. Culleton BF, Larson MG, Wilson PWF, Evans JC, Parfrey PS, Levy D. Cardiovascular disease and mortality in a community-based cohort with mild renal insufficiency. *Kidney Int*. 1999;56(6):2214–9.
 42. Go AS, Chertow GM, Fan D, McCulloch CE, Hsu C. Chronic Kidney Disease and the Risks of Death, Cardiovascular Events, and Hospitalization. *N Engl J Med*. 2004;351(13):1296–305.
 43. Hillege HL, Girbes ARJ, De Kam PJ, Boomsma F, De Zeeuw D, Charlesworth A, et al. Renal function, neurohormonal activation, and survival in patients with chronic heart failure. *Circulation*. 2000;102(2):203–210.
 44. Chade AR, Lerman A, Lerman LO. Kidney in early atherosclerosis. *Hypertension*. 2005;45(6):1042–9.
 45. Stenvinkel P, Alvestrand A. Inflammation in end-stage renal disease: Sources, consequences, and therapy. *Semin Dial*. 2002;5(5):329–37.
 46. Descamps-Latscha B, Witko-Sarsat V, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Gausson V, Mothu N, et al. Advanced oxidation protein products as risk factors for

- atherosclerotic cardiovascular events in nondiabetic predialysis patients. *Am J Kidney Dis.* 2005;45(1):39–47.
47. Foley RN, Parfrey PS, Sarnak MJ. Clinical epidemiology of cardiovascular disease in chronic renal disease. *Am J Kidney Dis.* 1998;32(5 Suppl 3):S112–119.
 48. Anavekar N, McMurray J, Velazquez E, Solomon S, Kober L, Rouleau J, et al. Relation between renal dysfunction and cardiovascular outcomes after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 2004;351(13):1285–95.
 49. United States Renal Data System. 2018 USRDS Annual Data Report: Epidemiology of kidney disease in the United States. National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Vol. 1, Bethesda, MD. 2018.
 50. Herzog CA, Ma JZ, Collins AJ. Poor long-term survival after acute myocardial infarction among patients on long-term dialysis. *N Engl J Med.* 1998;339(12):799–805.
 51. Lameire N. Cardiovascular problems in ESRD patients. *Nefrologia.* 2000;20 Suppl 3:33–40.
 52. Lewis E, Hunsicker L, Clarke W, Berl T, Pohl M, Lewis J, et al. Renoprotective effect of the angiotensin-receptor antagonist irbesartan in patients with nephropathy due to type 2 diabetes. *N Engl J Med.* 2001;345(12):851–60.
 53. Mattock MB, Barnes DJ, Viberti G, Keen H, Burt D, Hughes JM, et al. Microalbuminuria and coronary heart disease in NIDDM: an incidence study. *Diabetes.* 1998;47(11):1786–92.
 54. Mann JFE, Gerstein HC, Poque J, Bosch J, Yusuf S. Renal insufficiency as a predictor of cardiovascular outcomes and the impact of ramipril: The HOPE randomized trial. *Ann Intern Med.* 2001;134(8):629–636.
 55. Dikow R, Zeier M, Ritz E. Pathophysiology of cardiovascular disease and renal failure. *Cardiol Clin.* 2005;23(3):311–7.
 56. Liu Y, Coresh J, Eustace J, Longenecker J, Jaar B, Fink N, et al. Association between cholesterol level and mortality in dialysis patients: role of inflammation and malnutrition. *ACC Curr J Rev.* 2004;291(4):451–9.
 57. Shoji T, Nishizawa Y, Kawagishi T, Kawasaki K, Taniwaki H, Tabata T, et al. Intermediate-density lipoprotein as an independent risk factor for aortic atherosclerosis in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 1998;9(7):1277–1284.
 58. Kronenberg F, Neyer U, Lhotta K, Trenkwalder E, Auinger M, Pribasnig A, et al. The low molecular weight apo(a) phenotype is an independent predictor for coronary artery disease in hemodialysis patients: a prospective follow-up. *J Am Soc Nephrol.* 1999;10(5):1027–36.
 59. Block GA, Hulbert-Shearon TE, Levin NW, Port FK. Association of serum phosphorus and calcium x phosphate product with mortality risk in chronic hemodialysis patients: a national study. *Am J Kidney Dis.* 1998;31(4):607–17.
 60. Ganesh SK, Stack AG, Levin NW, Hulbert-Shearon T, Port FK. Association of elevated serum PO(4), Ca x PO(4) product, and parathyroid hormone with cardiac mortality risk in chronic hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2001;2(10):2131–2138.
 61. Shlipak M, Fried LF, Crump C, Bleyer AJ, Manolio TA, Tracy RP, et al. Elevations of inflammatory and procoagulant biomarkers in elderly persons with renal insufficiency. *Circulation.* 2003;107(1):87–92.

62. Bahlmann FH, De Groot K, Spandau JM, Landry AL, Hertel B, Duckert T, et al. Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood*. 2004;103(3):921–6.
63. Silverberg D. The cardio-renal anaemia syndrome: does it exist? *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18 Suppl 8:7viii – 12.
64. Guyton AC, Coleman TG. Quantitative analysis of the pathophysiology of hypertension. 1969. *J Am Soc Nephrol*. 1999;10(10):2248-2258.
65. Dounousi E, Papavasiliou E, Makedou A, Ioannou K, Katopodis KP, Tselepis A, et al. Oxidative Stress Is Progressively Enhanced With Advancing Stages of CKD. *Am J Kidney Dis*. 2006;48(5):752–60.
66. Ichikawa I, Kiyama S, Yoshioka T. Renal antioxidant enzymes: Their regulation and function. *Kidney Int*. 1994;45(1):1–9.
67. Witko-Sarsat V, Friedlander M, Capeillère-Blandin C, Nguyen-Khoa T, Nguyen AT, Zingraff J, et al. Advanced oxidation protein products as a novel marker of oxidative stress in uremia. *Kidney Int*. 1996;49(5):1304–13.
68. Toborek M, Wasik T, Drózd M, Klin M, Magner-Wróbel K, Kopieczna-Grzebeniak E. Effect of hemodialysis on lipid peroxidation and antioxidant system in patients with chronic renal failure. *Metabolism*. 1992;41(11):1229–32.
69. Epperlein MM, Nourooz-Zadeh J, Jayasena SD, Hothersall JS, Noronha-Dutra A, Neild GH. Nature and biological significance of free radicals generated during bicarbonate hemodialysis. *J Am Soc Nephrol*. 1998;9(3):457-63.
70. Locatelli F, Canaud B, Eckardt KU, Stenvinkel P, Wanner C, Zoccali C. Oxidative stress in end-stage renal disease: An emerging treat to patient outcome. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(7):1272–80.
71. Carr AC, McCall MR, Frei B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: Reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000;20(7):1716–23.
72. Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: Role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000;86(5):494–501.
73. Böger RH, Bode-Böger SM, Phivthong-Ngam L, Brandes RP, Schwedhelm E, Mügge A, et al. Dietary L-arginine and α -tocopherol reduce vascular oxidative stress and preserve endothelial function in hypercholesterolemic rabbits via different mechanisms. *Atherosclerosis*. 1998;141(1):31–43.
74. Vásquez-Vivar J, Kalyanaraman B, Martásek P, Hogg N, Masters BS, Karoui H, et al. Superoxide generation by endothelial nitric oxide synthase: the influence of cofactors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(16):9220–5.
75. Heitzer T, Brockhoff C, Mayer B, Warnholtz A, Mollnau H, Henne S, et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelium-dependent vasodilation in chronic smokers : evidence for a dysfunctional nitric oxide synthase. *Circ Res*. 2000;86(2):E36-41.
76. Descamps-Latscha B, Drüeke T, Witko-Sarsat V. Dialysis-induced oxidative stress: Biological aspects, clinical consequences, and therapy. *Semin Dial*. 2001;14(3):193–9.
77. Canaud B, Cristol JP, Morena M, Leray-Moragues H, Bosc JY, Vaussenat F. Imbalance of oxidants and antioxidants in haemodialysis patients. *Blood Purif*. 1999;17(2–3):99-106.
78. Del Vecchio L, Locatelli F, Carini M. What We Know About Oxidative Stress in Patients with Chronic Kidney Disease on Dialysis-Clinical Effects, Potential

- Treatment, and Prevention. *Semin Dial*. 2011;24(1):56–64.
79. Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42(7):1149–60.
 80. Badimón L, Martínez-González J. Disfunción endotelial. *Rev Española Cardiol Supl*. 2006;6(1):21A-30A.
 81. Nguyen-Khoa T, Massy ZA, Pascal De Bandt J, Kebede M, Salama L, Lambrey G, et al. Oxidative stress and haemodialysis: Role of inflammation and duration of dialysis treatment. *Nephrol Dial Transplant*. 2001;16(2):335–40.
 82. Mezzano D, Pais EO, Aranda E, Panes O, Downey P, Ortiz M, et al. Inflammation, not hyperhomocysteinemia, is related to oxidative stress and hemostatic and endothelial dysfunction in uremia. *Kidney Int*. 2001;60(5):1844–50.
 83. Barton GM. A calculated response: Control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*. 2008;118(2):413–20.
 84. Abbas AK, Lichtman AHH, Pillai S. *Cellular and Molecular Immunology*. 8th ed. Elsevier Health Sciences. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2014.
 85. Miyata T, Ueda Y, Horie K, Nangaku M, Tanaka S, Van Ypersele De Strihou C, et al. Renal catabolism of advanced glycation end products: The fate of pentosidine. *Kidney Int*. 1998;53(2):416–22.
 86. Anderson MM, Hazen SL, Hsu FF, Heinecke JW. Human neutrophils employ the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chloride system to convert hydroxy-amino acids into glycolaldehyde, 2-hydroxypropanal, and acrolein: A mechanism for the generation of highly reactive α -hydroxy and α,β -unsaturated aldehydes b. *J Clin Invest*. 1997;99(3):424–32.
 87. Vidt DG. Inflammation in renal disease. *Am J Cardiol*. 2006;97(2A):20A-27A.
 88. Bonetti PO, Lerman LO, Lerman A. Endothelial dysfunction: a marker of atherosclerotic risk. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003;23(2):168–75.
 89. Pannier B, Guerin AP, Marchais SJ, Metivier F, Safar ME, London GM. Postischemic vasodilation, endothelial activation, and cardiovascular remodeling in end-stage renal disease. *Kidney Int*. 2000;57(3):1091–9.
 90. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. *Nat Med*. 2002;8(11):1235–42.
 91. Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* (80-). 1991;251(4995):788–91.
 92. Bonomini M, Reale M, Santarelli P, Stuard S, Settefrati N, Albertazzi A. Serum levels of soluble adhesion molecules in chronic renal failure and dialysis patients. *Nephron*. 1998;79(4):399–407.
 93. Wang JM, Wang Y, Huang JY, Yang Z, Chen L, Wang LC, et al. C-reactive protein-induced endothelial microparticle generation in HUVECs is related to BH 4 - dependent NO formation. *J Vasc Res*. 2007;44(3):241–8.
 94. Zoccali C. Traditional and emerging cardiovascular and renal risk factors: An epidemiologic perspective. *Kidney Int*. 2006;70(1):26–33.
 95. Dignat-George F, Boulanger CM. The many faces of endothelial microparticles. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(1):27–33.
 96. Théry C, Ostrowski M, Segura E. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol*. 2009;9(8):581–93.
 97. Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC. Apoptotic bodies from endothelial cells enhance the number and initiate the differentiation of human endothelial

- progenitor cells in vitro. *Blood*. 2004;104(9):2761.
98. Wolf P. The nature and significance of platelet products in human plasma. *Br J Haematol*. 1967;13(3):269–88.
 99. Hugel B, Martínez MC, Kunzelmann C, Freyssinet J-M. Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiology*. 2005;20(1):22–7.
 100. György B, Módos K, Pállinger É, Pálóczi K, Pásztói M, Misják P, et al. Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood*. 2011;117(4):39–49.
 101. Chen Y, Li G, Liu ML. Microvesicles as Emerging Biomarkers and Therapeutic Targets in Cardiometabolic Diseases. *Genomics, Proteomics Bioinforma* [Internet]. 2018;16(1):50–62. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1672022918300019>
 102. Vanwijk MJ, Vanbavel E, Sturk A, Nieuwland R. Microparticles in cardiovascular diseases. *Cardiovasc Res* [Internet]. 2003;59(2):277–87. Available from: www.elsevier.com
 103. Coleman ML, Sahai EA, Yeo M, Bosch M, Dewar A, Olson MF. Membrane blebbing during apoptosis results from caspase-mediated activation of ROCK I. *Nat Cell Biol*. 2001;3:339–345.
 104. Mallat Z, Tedgui A. Current perspective on the role of apoptosis in atherothrombotic disease. *Circ Res*. 2001;88(10):998–1003.
 105. Boulanger CM, Amabile N, Tedgui A. Circulating microparticles: A potential prognostic marker for atherosclerotic vascular disease. *Hypertension*. 2006;48(2):180–6.
 106. Garcia BA, Smalley DM, Cho HJ, Shabanowitz J, Ley K, Hunt DF. The platelet microparticle proteome. *J Proteome Res*. 2005;4(5):1516–21.
 107. Dean WL, Lee MJ, Cummins TD, Schultz DJ, Powell DW, Dean B. Proteomic and functional characterisation of platelet microparticle size classes. *Thromb Haemost*. 2009;102(4):711–8.
 108. Combes V, Simon AC, Grau GE, Arnoux D, Camoin L, Sabatier F, et al. In vitro generation of endothelial microparticles and possible prothrombotic activity in patients with lupus anticoagulant. *J Clin Invest*. 1999;104(1):93–102.
 109. Sztowski B, Antoniak S, Goldin-Lang P, Tran QV, Pels K, Rosenthal P, et al. Antioxidative treatment inhibits the release of thrombogenic tissue factor from irradiation- and cytokine-induced endothelial cells. *Cardiovasc Res*. 2007;73(4):806–812.
 110. Brodsky S V., Malinowski K, Golightly M, Jesty J, Goligorsky MS. Plasminogen activator inhibitor-1 promotes formation of endothelial microparticles with procoagulant potential. *Circulation*. 2002;106(18):2372–2378.
 111. Sapet C, Simoncini S, Liorod B, Puthier D, Sampol J, Nguyen C, et al. Thrombin-induced endothelial microparticle generation: Identification of a novel pathway involving ROCK-II activation by caspase-2. *Blood*. 2006;108(6):1868–76.
 112. Faure V, Dou L, Sabatier F, Cerini C, Sampol J, Berland Y, et al. Elevation of circulating endothelial microparticles in patients with chronic renal failure. *J Thromb Haemost*. 2006;4(3):566–73.
 113. Chironi GN, Boulanger CM, Simon A, Dignat-George F, Freyssinet JM, Tedgui A. Endothelial microparticles in diseases. *Cell and Tissue Research*. 2009.
 114. Sluijter JPG, Verhage V, Deddens JC, Van Den Akker F, Doevendans PA.

- Microvesicles and exosomes for intracardiac communication. *Cardiovasc Res*. 2014;102(2):302–11.
115. Record M, Subra C, Silvente-Poirot S, Poirot M. Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochem Pharmacol*. 2011;81(10):1171–82.
 116. Chaput N, Théry C. Exosomes: Immune properties and potential clinical implementations. *Semin Immunopathol*. 2011;33(5):419–40.
 117. Leroyer AS, Ebrahimian TG, Cochain C, Récalde A, Blanc-Brude O, Mees B, et al. Microparticles from ischemic muscle promotes postnatal vasculogenesis. *Circulation*. 2009;119(21):2808–17.
 118. Koenen RR, Aikawa E. Extracellular Vesicle-Mediated Processes in Cardiovascular Diseases [Internet]. *Front Cardiovasc Med*. 2018. Available from: https://books.google.co.jp/books?id=uRxzDwAAQBAJ&pg=PA80&lpg=PA80&dq=soritin+1+osteoblast&source=bl&ots=76_qerkQT-&sig=ACfU3U1rJhqK2GC6WSmv1fKcSDAupYFSfw&hl=ja&sa=X&ved=2ahUKewiXuZbOjbDpAhX1yYsBHYDFAZEQ6AEwA3oECAsQAQ#v=onepage&q=soritin 1 osteoblast&f=f
 119. Sabatier F, Camoin-Jau L, Anfosso F, Sampol J, Dignat-George F. Circulating endothelial cells, microparticles and progenitors: Key players towards the definition of vascular competence. *J Cell Mol Med*. 2009;13(2):454–71.
 120. Nozaki T, Sugiyama S, Koga H, Sugamura K, Ohba K, Matsuzawa Y, et al. Significance of a Multiple Biomarkers Strategy Including Endothelial Dysfunction to Improve Risk Stratification for Cardiovascular Events in Patients at High Risk for Coronary Heart Disease. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(7):601–8.
 121. Amabile N, Boulanger CM. Circulating microparticle levels in patients with coronary artery disease: A new indicator of vulnerability? *Eur Heart J*. 2011;32(16):1958–60.
 122. Sinning JM, Losch J, Walenta K, Böhm M, Nickenig G, Werner N. Circulating CD31 +/Annexin V + microparticles correlate with cardiovascular outcomes. *Eur Heart J*. 2011;32(16):2034–41.
 123. Amabile N, Guerin AP, Leroyer A, Mallat Z, Nguyen C, Boddaert J, et al. Circulating Endothelial Microparticles Are Associated with Vascular Dysfunction in Patients with End-Stage Renal Failure. *J Am Soc Nephrol* [Internet]. 2005;16(11):3381–8. Available from: <http://jasn.asnjournals.org/cgi/content/abstract/16/11/3381%5Cnhttp://jasn.asnjournals.org/cgi/reprint/16/11/3381.pdf>
 124. Brodsky S V., Zhang F, Nasjletti A, Goligorsky MS. Endothelium-derived microparticles impair endothelial function in vitro. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol* [Internet]. 2004;286(5 55-5):1910–5. Available from: <http://ajpheart.physiology.org/cgi/doi/10.1152/ajpheart.01172.2003>
 125. Vader P, Mol EA, Pasterkamp G, Schiffelers RM. Extracellular vesicles for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016;106:148–56. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2016.02.006>
 126. Lovren F, Verma S. Evolving role of microparticles in the pathophysiology of endothelial dysfunction. *Clin Chem*. 2013;59(8):1166–74.
 127. Baron M, Boulanger CM, Staels B, Tailleux A. Cell-derived microparticles in atherosclerosis: Biomarkers and targets for pharmacological modulation? *J Cell Mol Med*. 2012;16(7):1365–76.

128. Curtis AM, Edelberg J, Jonas R, Rogers WT, Moore JS, Syed W, et al. Endothelial microparticles: Sophisticated vesicles modulating vascular function. *Vasc Med (United Kingdom)*. 2013;18(4):204–14.
129. Clinical J, Mahajan K. Microparticles in Atherosclerosis: Biomarkers of Disease. *J Clin Exp Cardiol*. 2015;06(01):3676–9.
130. Burger D, Montezano AC, Nishigaki N, He Y, Carter A, Touyz RM. Endothelial microparticle formation by angiotensin II is mediated via ang II receptor type I/NADPH Oxidase/rho kinase pathways targeted to lipid rafts. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011;31(8):1898–907.
131. Densmore JC, Signorino PR, Ou J, Hatoum OA, Rowe JJ, Shi Y, et al. Endothelium-derived microparticles induce endothelial dysfunction and acute lung injury. *Shock*. 2006;26(5):464–71.
132. Buesing KL, Densmore JC, Kaul S, Pritchard KA, Jarzembowski JA, Gourlay DM, et al. Endothelial microparticles induce inflammation in acute lung injury. *J Surg Res*. 2011;166(1):32–9.
133. Böing AN, Hau CM, Sturk A, Nieuwland R. Platelet microparticles contain active caspase 3. *Platelets*. 2008;19(2):96–103.
134. Abid Hussein MN, Nieuwland R, Hau CM, Evers LM, Meesters EW, Sturk A. Cell-derived microparticles contain caspase 3 in vitro and in vivo. *J Thromb Haemost*. 2005;3(5):888–96.
135. Meijers BKL, Van kerckhoven S, Verbeke K, Dehaen W, Vanrenterghem Y, Hoylaerts MF, et al. The Uremic Retention Solute p-Cresyl Sulfate and Markers of Endothelial Damage. *Am J Kidney Dis*. 2009;54(5):891–901.
136. Abbasian N, Burton JO, Herbert KE, Tregunna B-E, Brown JR, Ghaderi-Najafabadi M, et al. Hyperphosphatemia, Phosphoprotein Phosphatases, and Microparticle Release in Vascular Endothelial Cells. *J Am Soc Nephrol [Internet]*. 2015;1–11. Available from: <http://www.jasn.org/cgi/doi/10.1681/ASN.2014070642>
137. Carmona A, Guerrero F, Buendia P, Obrero T, Aljama P, Carracedo J. Microvesicles derived from Indoxyl sulfate treated endothelial cells induce endothelial progenitor cells dysfunction. *Front Physiol*. 2017;8:666.
138. Carmona A, Agüera ML, Luna-Ruiz C, Buendía P, Calleros L, García-Jerez A, et al. Markers of endothelial damage in patients with chronic kidney disease on hemodialysis. *Am J Physiol Physiol*. 2017;312(4):F673–81.
139. Green D, Skeoch S, Alexander MY, Kalra PA, Parker B. The Association of Baseline and Longitudinal Change in Endothelial Microparticle Count with Mortality in Chronic Kidney Disease. *Nephron*. 2017;135(4):252–60.
140. Dvorak HF. Angiogenesis: Update 2005. *J Thromb Haemost*. 2005;3(8):1835–4182.
141. Shibuya M. Structure and function of VEGF/VEGF-receptor system involved in angiogenesis. *Cell Struct Funct*. 2001;26(1):25–35.
142. Hoebe ANN, Landuyt B, Highley MSM, Wildiers H, Oosterom ATVAN, Bruijn EADE, et al. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis. *Pharmacol Rev [Internet]*. 2004;56(4):549–80. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/content/56/4/549.full%5Cnhttp://pharmrev.aspetjournals.org/content/56/4/549.short>
143. Martin O, Caramelo C, Alvarez Arroyo M V, Castilla MA, Gonzalez-Pacheco FR. Papel del factor de crecimiento vascular (VEGF) en la respuesta proliferativa endotelial. *Nefrologia*. 1998;18(Suppl 1):112–4.






144. Caramelo C, Álvarez-Arroyo M V, Castilla MA, Yagüe S, Deudero JJP, González-Pacheco FR, et al. Papel del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en la protección de las células endoteliales. *Nefrologia*. 2004;24(Suppl 1):6–7.
145. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, Brett J, Wang F, Familletti PC, et al. Vascular permeability factor: A tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. *J Exp Med*. 1990;172(6):1535–45.
146. Inoue M, Itoh H, Ueda M, Naruko T, Kojima A, Komatsu R, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in human coronary atherosclerotic lesions: possible pathophysiological significance of VEGF in progression of atherosclerosis. *Circulation*. 1998;98(20):2108–16.
147. Celletti FL, Waugh JM, Amabile PG, Brendolan A, Hilfiker PR, Dake MD. Vascular endothelial growth factor enhances atherosclerotic plaque progression. *Nat Med*. 2001;7(4):425–9.
148. Zou X, Gu D, Xing X, Cheng Z, Gong D, Zhang G, et al. Human mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles alleviate renal ischemic reperfusion injury and enhance angiogenesis in rats. *Am J Transl Res*. 2016;8(10):4289–99.
149. Hayon Y, Dashevsky O, Shai E, Brill A, Varon D, R. Leker R. Platelet Microparticles Induce Angiogenesis and Neurogenesis after Cerebral Ischemia. *Curr Neurovasc Res*. 2012;9(3):185–92.
150. Robert S, Poncelet P, Lacroix R, Arnaud L, Giraudo L, Hauchard A, et al. Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: A first step towards multicenter studies? *J Thromb Haemost*. 2009;7(1):190–7.
151. Rich RR, Fleisher TA, Shearer WT, Schroeder HW, Frew AJ, Weyand CM. Clinical immunology: Principles and practice: Fourth edition. *Clinical Immunology: Principles and Practice: Fourth Edition*. 2012.
152. Kdigo. Clinical Practice Guideline for Lipid Management in Chronic Kidney Disease. *Kidney Int*. 2013;3(3):259–303.
153. Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Culleton B, Hamm LL, et al. Kidney Disease as a Risk Factor for Development of Cardiovascular Disease. *Circulation* [Internet]. 2003 Oct 27;108(17):2154–69. Available from: <http://circ.ahajournals.org/content/108/17/2154.abstract>
154. Sociedad Española de Nefrología (SEN), Autónomas Registro Español de Enfermos Renales de las Comunidades, Organización nacional de trasplantes ONT, Registro español de enfermos Renales. Informe de diálisis y Trasplantes 2018. *Inf 2018 Congr la Soc Española Nefrol (SEN)*, 2019 [Internet]. 2019; Available from: https://www.senefro.org/contents/webstructure/SEN_2019_REER_modificada.pdf
155. Nakanishi T, Ishigami Y, Otaki Y, Izumi M, Hiraoka K, Inoue T, et al. Impairment of Vascular Responses to Reactive Hyperemia and Nitric Oxide in Chronic Renal Failure. *Nephron* [Internet]. 2002;92(3):529–35. Available from: <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000064078>
156. Wever R, Boer P, Hijmering M, Stroes E, Verhaar M, Kastelein J, et al. Nitric oxide production is reduced in patients with chronic renal failure. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* [Internet]. 1999;19(5):1168–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10323766>
157. Xiao YS, Fan FH, Hong XN, Guo BW, Xie D, Zhi JG, et al. Advanced oxidation protein

- products promote inflammation in diabetic kidney through activation of renal nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase. *Endocrinology*. 2008;149(4):1829–39.
158. Fernandez-Martínez AB, Torija AV, Carracedo J, Ramirez R, De Lucio-Cazaña FJ. Microparticles released by vascular endothelial cells increase hypoxia inducible factor expression in human proximal tubular HK-2 cells. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2014;53:334–42. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1357272514001836>
 159. Mahmoud AM, Wilkinson FL, McCarthy EM, Moreno-Martinez D, Langford-Smith A, Romero M, et al. Endothelial microparticles prevent lipid-induced endothelial damage via Akt/eNOS signaling and reduced oxidative stress. *FASEB J*. 2017;31(10):4636–48.
 160. Khamaisi M, Schrijvers BF, De Vriese AS, Raz I, Flyvbjerg A. The emerging role of VEGF in diabetic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2003;18(8):1427–30.
 161. Neves KB, Rios FJ, Jones R, Evans TRJ, Montezano AC, Touyz RM. Microparticles from vascular endothelial growth factor pathway inhibitor-treated cancer patients mediate endothelial cell injury. *Cardiovasc Res*. 2019;115(5):978–88.
 162. Diamant M, Tushuizen ME, Abid-Hussein MN, Hau CM, Böing AN, Sturk A, et al. Simvastatin-induced endothelial cell detachment and microparticle release are prenylation dependent. *Thromb Haemost*. 2008;100(3):489–97.
 163. Baigent C, Landray MJ, Reith C, Emberson J, Wheeler DC, Tomson C, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection): A randomised placebo-controlled trial. *Lancet*. 2011;377(9784):2181–92.
 164. Huang B, Cheng Y, Xie Q, Lin G, Wu Y, Feng Y, et al. Effect of 40 mg Versus 10 mg of Atorvastatin on Oxidized Low-Density Lipoprotein, High-Sensitivity C-Reactive Protein, Circulating Endothelial-Derived Microparticles, and Endothelial Progenitor Cells in Patients With Ischemic Cardiomyopathy. *Clin Cardiol* [Internet]. 2012;35(2):125–30. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271072>
http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/clc.21017/asset/21017_ftp.pdf?v=1&t=gyla3nbh&s=975b0a462d2c01469284d169b1c70e6751769c69 LA - eng%5Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22271072> http://onlinelibrary.wiley.com/store/10.1002/clc.21017/asset/21017_ftp.pdf?v=1&t=gyla3nbh&s=975b0a462d2c01469284d169b1c70e6751769c69
 165. Huang PH, Chen JY, Chen CY, Chen JW, Lin SJ, Shih CC. Simvastatin pretreatment enhances ischemia-induced neovascularization and blood flow recovery in streptozotocin-treated mice. *J Vasc Surg*. 2016;64(4):1112–1120.e1.
 166. Lampi MC, Faber CJ, Huynh J, Bordeleau F, Zanotelli MR, Reinhart-King CA. Simvastatin ameliorates matrix stiffness-mediated endothelial monolayer disruption. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147033.
 167. Tramontano AF, O’Leary J, Black AD, Muniyappa R, Cutaia M V., El-Sherif N. Statin decreases endothelial microparticle release from human coronary artery endothelial cells: Implication for the Rho-kinase pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;320(1):34–8.
 168. Takemoto M, Liao JK. Pleiotropic effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001;21(11):1712–9.
 169. Van Aelst L, D’Souza-Schorey C, Schmitz, A. A., Govek, E. E., Böttner, B., & Van Aelst L. Rho GTPases and signaling networks. *Genes and Development*. 1997.

170. Schmitz AA, Govek EE, Böttner B, Van Aelst L. Rho GTPases: Signaling, migration, and invasion. *Exp Cell Res*. 2000;261(1):1–12.
171. Aznar S, Lacal JC. Rho signals to cell growth and apoptosis. *Cancer Lett*. 2001;165(1):1–10.
172. Monobe H, Yamanari H, Nakamura K, Ohe T. Effects of low-dose aspirin on endothelial function in hypertensive patients. *Clin Cardiol*. 2001;24:705–9.
173. Bulut D, Becker V, Mügge A. Acetylsalicylate reduces endothelial and platelet-derived microparticles in patients with coronary artery disease. *Can J Physiol Pharmacol* [Internet]. 2011;89(4):239–44. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/y11-013>
174. Taubert D, Berkels R, Grosser N, Schröder H, Gründemann D, Schömig E. Aspirin induces nitric oxide release from vascular endothelium: A novel mechanism of action. *Br J Pharmacol*. 2004;143(1):159–65.
175. Eitan E, Green J, Bodogai M, Mode NA, Bæk R, Jørgensen MM, et al. Age-Related Changes in Plasma Extracellular Vesicle Characteristics and Internalization by Leukocytes. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–14.
176. Forest A, Pautas E, Ray P, Bonnet D, Verny M, Amabile N, et al. Circulating microparticles and procoagulant activity in elderly patients. *Journals Gerontol - Ser A Biol Sci Med Sci*. 2010;65 A(4):414–20.
177. Esposito K, Ciotola M, Schisano B, Gualdiero R, Sardelli L, Misso L, et al. Endothelial microparticles correlate with endothelial dysfunction in obese women. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(9):3676–9.
178. Ruzicka M, Xiao F, Abujrad H, Al-Rewashdy Y, Tang VA, Langlois MA, et al. Effect of hemodialysis on extracellular vesicles and circulating submicron particles. *BMC Nephrol*. 2019;20(1):1–8.
179. De Laval P, Mobarrez F, Almquist T, Vassil L, Fellström B, Soveri I. Acute effects of haemodialysis on circulating microparticles. *Clin Kidney J*. 2019;12(3):456–62.
180. Hou W, Lv JA, Perkovic V, Yang L, Zhao N, Jardine MJ, et al. Effect of statin therapy on cardiovascular and renal outcomes in patients with chronic kidney disease: A systematic review and meta-analysis. *Eur Heart J*. 2013;34(24):1807–17.
181. Wang Y, Chen L-M, Liu M-L. Microvesicles and diabetic complications — novel mediators, potential biomarkers and therapeutic targets. *Nat Publ Gr* [Internet]. 2014;35(10):433–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/aps.2013.188>
182. Jansen F, Yang X, Baumann K, Przybilla D, Schmitz T, Flender A, et al. Endothelial microparticles reduce ICAM-1 expression in a microRNA-222-dependent mechanism. *J Cell Mol Med*. 2015;19(9):2202–14.
183. Gasser, Olivier1. Gasser O SJA polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *B* 2004;; Schifferli JA. Activated polymorphonuclear neutrophils disseminate anti-inflammatory microparticles by ectocytosis. *Blood*. 2004;104(8):2543–8.
184. Ambros V. microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*. 2001;107(7):823–6.

Anexos

ANEXO 1. Aprobación por el Comité de Ética de la Investigación con Medicamentos

 SaludMadrid	Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda	 Comunidad de Madrid
 D^a. CRISTINA AVENDAÑO SOLÁ, PRESIDENTA DEL COMITÉ ETICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO MAJADAHONDA DE MADRID CERTIFICA Que dicho Comité ha evaluado el proyecto de investigación titulado: “PAPEL DE MICRORNAS VEHICULADOS POR MICROPARTICULAS DE CÉLULAS SENESCENTES EN LA ENFERMEDAD VASCULAR ASOCIADA A LA ENFERMEDAD RENAL CRÓNICA POR NEFROPATÍA DIABÉTICA.” del que es Investigador Principal en nuestro centro el Dr. Portolés, del Hospital Infanta Leonor el Dr. Rafael Pérez y de la Universidad de Alcalá el Dr. Rafael Ramírez, considerando que su planteamiento global es aceptable desde el punto de vista metodológico y ético. Acta nº 304. En Majadahonda, a 10 de noviembre de 2014 <div style="text-align: center;"> Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda  Comité Ético de Investigación Clínica</div> Fdo.: Dra. Avendaño Solá Presidenta del CEIC		
 <div style="display: flex; justify-content: space-between;"><div style="width: 30%;">ZONA NOROESTE C/ Joaquín Rodrigo, 2 28222 Majadahonda / Madrid</div><div style="width: 30%; text-align: center;"> Red HsH Hospitales sin Humo</div></div>		

ANEXO 2. Resumen del Proyecto FIS PI14 / 00806


GOBIERNO DE ESPAÑA


MINISTERIO DE CIENCIA E INNOVACIÓN


Fondo de Investigación en Salud
Instituto de Salud Carlos III


portal fis


Unión Europea
Fondo Europeo de Desarrollo Regional
"Una manera de hacer Europa"

Ayuda

Inicio
Búsqueda de Proyectos
Detalle de Proyecto

Papel de microRNAs vehiculados por micropartículas de células senescentes en la enfermedad vascular asociada a la enfermedad renal crónica por nefropatía diabética

Resumen del proyecto

Los pacientes con enfermedad renal crónica (ERC) presentan un alto riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular, que parece estar vinculado al desarrollo prematuro de senescencia endotelial. Datos preliminares, sugieren que estas células senescentes producen micropartículas y/o microRNAs anómalos incapaces de estimular la angiogénesis y vasculogénesis endotelial y como consecuencia la homeostasis vascular. En este proyecto, proponemos estudiar si la alteración en los procesos de angiogénesis y vasculogénesis asociados a senescencia endotelial en la enfermedad vascular asociada a ERC por nefropatía diabética se produce asociada de cambios en miRNAs libres o vehiculados en micropartículas endoteliales, y en especial del miRNA 126; y si estos cambios se pueden modificar por intervenciones terapéuticas (diálisis). Para ello, en el plasma de en pacientes con ERC por nefropatía diabética estudiaremos mediante citometría de flujo y microscopía confocal y electrónica los niveles de micropartículas endoteliales. Igualmente, mediante PCR cuantitativa analizaremos los niveles plasmáticos de microRNAs libres y vehiculados en micropartículas. Ambas variables, se correlacionaran con indicadores clínicos y de laboratorio asociados de enfermedad cardiovascular. Igualmente, analizaremos el efecto de diferentes técnicas de diálisis peritoneal y hemodiálisis sobre los niveles plasmáticos de micropartículas y/o microRNAs. Por último, utilizaremos modelos experimentales para caracterizar como afecta la senescencia endotelial modifica la angiogénesis y vasculogénesis, y si este alteración esta mediada por micropartículas endoteliales y/o microRNAs.

Palabras clave

enfermedad renal crónica
insuficiencia renal crónica
micropartículas endoteliales
microRNA
microARN
senescencia endotelial

Periodo de ejecución

01/01/2015 - 31/12/2017

Investigador Principal

RAMIREZ CHAMOND, MANUEL RAFAEL

Centro beneficiario

UNIVERSIDAD DE ALCALA

Centro de realización

UNIVERSIDAD DE ALCALA

Comunidad Autónoma

MADRID

Provincia

MADRID

Financiación

193.298 €

ANEXO 3. Resumen del Proyecto FIS PI19 / 00240






[Inicio](#)
[Búsqueda de Proyectos](#)
[Detalle de Proyecto](#)

Vesículas extracelulares como biomarcadores pronósticos de la enfermedad cardiovascular asociada a enfermedad renal crónica

Resumen del proyecto

El objetivo principal de este proyecto es caracterizar el papel de las vesículas extracelulares (VE) como biomarcador temprano y como posible terapia en las enfermedades cardiovasculares (ECV) asociadas a hemodiálisis. Además, con este proyecto se quiere fomentar el desarrollo de la Dra. Alique como grupo emergente de investigación traslacional en el ámbito renal y cardiovascular. Los estudios propuestos se llevarán a cabo en los laboratorios de la Universidad de Alcalá perteneciente al IRYCIS junto con las Unidades de Nefrología de los Hospitales Universitarios Infanta Leonor y Puerta de Hierro de Madrid pertenecientes a la RETICS-REDinREN del ISCIII y el Instituto de Investigación Sanitarias del Hospital Puerta de Hierro. Trabajos previos de nuestro grupo confirman que la senescencia endotelial prematura en pacientes con enfermedades renales crónicas (ERC) produce VE alteradas que promueven la ECV. Observamos que la actividad fisiopatológica de estas VE está modulada por la función renal residual, las técnicas de hemodiálisis o fármacos como estatinas o agentes antiplaquetarios, destacando el uso de las VE como nueva diana terapéutica. El objetivo general es establecer la relevancia clínica de las VE en el desarrollo de ECV como consecuencia de la ERC. Para ello, los objetivos propuestos son: (1) continuar la caracterización de estas VE en pacientes con ERC en hemodiálisis, (2) evaluar el efecto de los nuevos enfoques de hemodiálisis en su actividad fisiopatológica, incluido lo que se observó en pacientes en diálisis peritoneal, y (3) el análisis del valor predictivo de la determinación de las EV en los eventos cardiovasculares para confirmar la utilidad de las VE como biomarcadores tempranos de daño vascular. Estos objetivos resumen la utilidad de los datos obtenidos en un estudio de seguimiento clínico, y la utilidad de las VE para identificar a los pacientes en hemodiálisis con riesgo de desarrollar ECV y un posible objetivo para la intervención terapéutica.

Palabras clave

Vesículas extracelulares
Enfermedad renal
Enfermedad Cardiovascular
hemodiálisis
biomarcador pronóstico
biomarcador predictivo
diana terapéutica

Periodo de ejecución

01/01/2020 - 31/12/2022

Investigador Principal

ALIQUE AGUILAR, MATILDE

Centro beneficiario

FUNDACION INVESTIGACION BIOMEDICA HOSPITAL RAMON Y CAJAL

Centro de realización

INSTITUTO RAMON Y CAJAL DE INVESTIGACION SANITARIA (IRYCIS)

Comunidad Autónoma

MADRID

Provincia

MADRID

Financiación

159.720 €

ANEXO 4. Consentimientos informados



Código de
identificación

CONSENTIMIENTO PARA ANÁLISIS DE MUESTRA BIOLÓGICA

Yo (paciente),

He sido informado por el Dr., miembro del equipo habitual responsable de mi tratamiento sobre el estudio titulado: *“Papel de microRNAs vehiculados por micropartículas de células senescentes en la enfermedad vascular asociada a la enfermedad renal crónica por nefropatía diabética”*. Se trata de un estudio financiado por el Instituto de Salud Carlos III que tiene por finalidad conocer los mecanismos generales de progresión de la enfermedad renal y que no proporcionará información relevante que afecte directamente a mi tratamiento individual. La participación en dicho estudio conlleva una extracción única de sangre, sin otra interferencia con la pauta de tratamiento, ni con el programa de seguimiento clínico habitual. Dicho estudio colaborativo está aprobado por el CEIC del Hospital Puerta de Hierro e implica médicos de dicho hospital e investigadores de la Universidad de Alcalá.

Entiendo que no recibiré ninguna compensación por la participación en este estudio así como tampoco la recibirá el personal investigador del mismo.

☐ Autorizo a que (me) extraigan sangre para realizar el estudio de investigación arriba señalado según me han explicado anteriormente.

Con mi firma declaro que:

1. He recibido toda la información que considero precisa.
2. He podido hacer todas las preguntas necesarias.
3. Entiendo que mi participación o no participación no afectará al tratamiento y seguimiento
4. Entiendo que puedo retirar mi consentimiento en cualquier momento.

Además, cuando los resultados hayan sido completados, si hay material biológico no utilizado (excedente de investigación):

☐ SI quisiera que fuera almacenado en el biobanco del Hospital Puerta de Hierro para ser usado en un futuro para otros proyectos de investigación relacionados con la patología renal.

☐ NO quisiera que fuera almacenada y pido que se destruya una vez completado el presente estudio.

Firma del participante o familiar

Testigo (caso de firma por familiar)

D/Dña.....

D/Dña.....

Firma del Médico que realiza solicitud Dr:.....

Fecha



HOJA DE INFORMACIÓN

DONACIÓN DE MUESTRAS EXCEDENTES DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN AL BIOBANCO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO-MAJADAHONDA (HUPH-M)

El **Biobanco HUPH-M** es un departamento donde se conservan muestras biológicas (tejidos, ADN y otros derivados) con las adecuadas garantías de seguridad y confidencialidad, con el fin de utilizarlas en la investigación de las enfermedades y contribuir a la obtención de conocimientos para mejorar el tratamiento de los pacientes. El Biobanco HUPH-M cuenta con los medios necesarios para el procesamiento y la conservación de muestras biológicas.

Conforme recoge la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica, de 3 de Julio de 2007, (LIB) y el Real Decreto (RD) 1716/2011 por el que se regula el funcionamiento de los Biobancos, se solicita su autorización escrita para la donación gratuita y el almacenamiento en el Biobanco HUPH-M, del sobrante/excedente de su/s muestra/s biológica/s utilizada/s en el proyecto de investigación en el que participa, así como los datos asociados a la misma, con el fin de utilizar dicho sobrante en investigación biomédica.

Su muestra será **almacenada por un tiempo indefinido**, durante el cual estará disponible para la realización de diferentes proyectos de investigación del propio centro o de otros centros que lo soliciten. Asimismo, se informa que la muestra **podrá ser cedida a terceros**, tanto a nivel comunitario como a terceros países no comunitarios, para su uso en investigación biomédica. En cualquiera de los casos, el Biobanco tomará las medidas necesarias para garantizar la confidencialidad de su información personal. Se garantiza también que los proyectos de investigación para los que se ceden deberán pasar favorablemente la revisión de los correspondientes Comités Ético y Científico.

Su colaboración en esta **donación es completamente voluntaria** y no supone ningún gasto adicional para usted. Por otra parte la donación tiene por disposición legal carácter altruista, por lo que usted no obtendrá ni ahora ni en el futuro **ningún beneficio económico** por la misma. No está previsto compensarle por los productos desarrollados a partir de esta investigación. En todo caso, usted renuncia a cualquier beneficio económico que pudiera corresponderle en el futuro y que sea, lógicamente, renunciabile.

Su participación tampoco supondrá **ningún riesgo o molestia adicional** para usted, ya que no se realizará ninguna prueba o intervención distinta de aquella en la que se obtiene la muestra, de tal manera que únicamente va a autorizar la investigación con muestras sobrantes, que de otra forma se desecharían, y su incorporación a un Biobanco.

En cualquier caso, usted **podrá revocar en cualquier momento su consentimiento**, solicitando la destrucción o anonimización de las muestras (destrucción del código que vincula la muestra con su identidad). Esta revocación no tendría ningún efecto sobre su tratamiento médico futuro y su muestra dejaría de formar parte del Biobanco, aunque los datos obtenidos hasta ese momento sí formarían parte de la misma.

En el momento en que usted consienta, **su muestra será sometida a un proceso de disociación**, es decir, sólo será identificado por un número y/o un código, constando todos sus datos debidamente codificados. De esta manera, el excedente de muestra cedido y sus datos asociados serán identificados por un código de modo que los investigadores nunca conocerán su identidad; sin embargo, sí podrán tener acceso a otros datos como su sexo o edad, manteniendo la confidencialidad conforme a la legislación vigente en materia de protección de datos de carácter personal.

Los resultados de los estudios llevados a cabo pueden ser publicados en revistas científicas, sin que ello suponga la revelación de ningún dato personal que pueda llegar a identificarle. De igual modo, se le informa que sus **datos personales serán incorporados a un fichero automatizado de carácter confidencial**, debidamente inscrito en la Agencia Española de Protección de Datos, con la finalidad de gestionar el Biobanco, conforme a los términos establecidos en la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, pudiendo ejercer en cualquier momento los derechos de acceso, rectificación, cancelación u oposición al tratamiento de información descrito en líneas anteriores, reconocidos por la citada normativa en materia de protección de datos de carácter personal, poniéndose para ello en contacto con el Centro en la siguiente dirección:

BIOBANCO HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO-MAJADAHONDA. C/ Joaquín Rodrigo, 2
Edificio Laboratorios, planta 3 - 28222 Majadahonda – Madrid (biobanco@idiphim.org)

En caso de que de las futuras investigaciones que se lleven a cabo se desprendiesen datos que pudieran ser tanto clínica como genéticamente relevantes para su salud, o la de su familia, **Ud. debe decidir si quiere recibir o no dicha información**, para lo que deberá cumplimentar el correspondiente apartado que se recoge en la hoja de consentimiento (firmas) posterior. Si Ud. no deseara recibir dicha información y, siempre que fuera necesario según criterio del médico o investigador responsable, para evitar un perjuicio para su salud o la de sus familiares, se informará a un representante, previa consulta a los correspondientes Comités de Ética, limitándose la comunicación a los datos estrictamente necesarios para evitar dichos perjuicios.

Finalmente, en caso de producirse un eventual cierre del Biobanco HUPH-M o la revocación de la autorización para su constitución y funcionamiento, la información sobre el destino de sus muestras estará a su disposición en el Registro Nacional de Biobancos para Investigación Biomédica, con el fin de que Ud. pueda manifestar su conformidad o disconformidad con el destino previsto para las muestras, todo ello sin perjuicio de la información que recibiría por escrito antes de otorgar su consentimiento para la obtención y utilización de la muestra.

NOMBRE:

APELLIDOS:

Nº HISTORIA CLÍNICA:



Hospital Universitario
Puerta de Hierro Majadahonda
Comunidad de Madrid

CONSENTIMIENTO INFORMADO

**DONACIÓN DE MUESTRAS EXCEDENTES DE PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN AL
BIOBANCO DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO PUERTA DE HIERRO-MAJADAHONDA
(HUPH-M)**

Nombre y apellidos del donante.....

DNI.....

Edad.....

Persona del centro que informa.....

DNI.....

El abajo firmante autoriza al **Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda** a que el material biológico **sobrante de su muestra biológica utilizada en el proyecto de investigación en el que participa** sea incorporado en el Biobanco HUPH y que sea cedido desde el mismo con la finalidad de llevar a cabo proyectos de investigación biomédica, siempre que éstos cuenten con la obligada aprobación del Comité de Ética de Investigación competente. Esta autorización la concede tras haber sido informado verbalmente y haber leído la **HOJA DE INFORMACIÓN** adjunta.

En caso de menor o incapacitado (rellenar y firmar por el representante legal o tutor)*

Nombre y apellidos del representante.....

DNI.....

Relación con el donante.....

Se me ha informado que, llegada la mayoría de edad de mi representado, este tendrá derecho a revocar o modificar este consentimiento, para lo cual deberá estar debidamente informado. En caso de que no ejerza dicho derecho, se considerará que el actual documento sigue vigente.

AUTORIZACIÓN DE INFORMACIÓN

- Autorizo a que el excedente de muestra utilizado para proyecto, así como mi información clínica y mis datos identificativos se utilicen para investigación en los términos recogidos en la Hoja de Información

SÍ ☐ NO ☐

-Autorizo que se me comunique la información importante para mi persona o la de mis familiares derivada de la investigación

SÍ ☐ NO ☐

Teléfono o E-mail de contacto:.....

-Autorizo a ser contactado en el caso que se necesite más información para cualquier proyecto en el que se utilicen mis muestras

SÍ ☐ NO ☐

Teléfono o E-mail de contacto:.....

-Autorizo a anonimizar, y no destruir, mi muestra en caso de revocación del presente asentimiento

SÍ ☐ NO ☐**DONANTE**

Firma

PERSONA QUE INFORMA

Firma

***REPRESENTANTE / TUTOR**

Firma

En a de de 20.....

2/3

HOJA INFORMATIVA

Se le ha invitado a participar en un estudio sobre los mecanismos celulares implicados en el desarrollo de la enfermedad vascular asociada a la enfermedad renal. Antes de que acepte participar en este estudio, es importante que comprenda por qué se va a realizar esta investigación.

Por favor, lea esta información con detenimiento y coméntela con sus familiares, amigos y su médico si así lo desea.

Puede preguntar todo lo que no entienda y solicitar más información. Tómese su tiempo para decidir si desea o no participar en el estudio. Su decisión no afectará a la atención médica que reciba ni al tratamiento que pueda necesitar. Si desea participar, su médico le pedirá que confirme por escrito que ha leído y comprendido la información contenida en este documento.

Se le entregará una copia de este documento por si desea volver a consultarlo.

¿Cuál es el objetivo de este estudio?

El principal objetivo de este estudio es determinar si el daño endotelial asociado a la enfermedad renal crónica se acompaña de unos mediadores biológicos (micropartículas), que no actúan de forma adecuada estimulando los mecanismos de regeneración vascular.

¿Estoy obligado a participar?

Su participación en este estudio es completamente voluntaria. Puede negarse a participar en el mismo, sin tener que dar explicaciones y sin que ello tenga consecuencias sobre su tratamiento ni sobre la calidad de la asistencia que seguirá recibiendo de su médico.

Si accede a tomar parte en el estudio, se le entregará este documento informativo para que lo guarde y se le pedirá que firme un formulario de consentimiento. Esta decisión no afectará a los cuidados que reciba ni a su tratamiento.

¿Qué tengo que hacer?

En el estudio se recogerán muestras extra de sangre coincidiendo con una extracción rutinaria de su seguimiento clínico. Dichas muestras serán guardadas durante tres años a partir de su obtención. Se utilizarán datos clínicos sobre su enfermedad, información relativa a la medicación que toma y datos analíticos que ya figuran en su historia clínica. Se mantendrá su anonimato. Se mantendrá la misma pauta de seguimiento en consulta externa que venía realizando antes de entrar en el estudio.

¿Cuáles son los riesgos o inconvenientes de participar?

No corre ningún riesgo por participar en el estudio, su médico no cambiará la atención ni el tratamiento que recibe.

¿Cuáles son las ventajas de participar?

Esperamos que la información obtenida en el presente estudio nos proporcione datos suficientes que nos permita comprender y mejorar el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad vascular asociada a la enfermedad renal crónica. No obstante, no se espera obtener ningún resultado que pueda ser utilizado de forma inmediata para su beneficio.

¿Será confidencial mi participación en este estudio?



Si accede a formar parte del estudio, se mantendrá su anonimato. Solo conocerán su nombre el médico y el personal que depende de él.

Este estudio se llevará a cabo de acuerdo a la normativa de la Ley Orgánica 15/1999 del 13 de Diciembre sobre la Protección de Datos Personales.

El paciente tiene derecho de acceso, rectificación y cancelación de sus datos en cualquier momento.

¿Qué se hará con los resultados del estudio de investigación?

Si los resultados de la investigación llegan a publicarse, su identidad será confidencial.

Si es necesario referirse a usted, se utilizarán códigos numéricos que no permitan su identificación.

FORMULARIO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

Título del proyecto: Papel de microRNAs vehiculados por micropartículas de células senescentes en la enfermedad vascular asociada a la enfermedad renal crónica de origen diabético

Yo,.....(nombre del participante).

-He leído la hoja de información que se me ha entregado.

-He podido hacer preguntas sobre el estudio.

-He recibido suficiente información sobre el estudio.

-He hablado con el Dr..... (nombre del investigador), y comprendo que mi participación es voluntaria, que puedo retirarme mi permiso cuando quiera sin tener que dar explicaciones, y sin que ello repercuta en mis cuidados médicos.

Por todo ello presto libremente mi conformidad para participar en el estudio

Fecha

Firma del paciente

Firma del Médico que realiza la solicitud

ANEXO 5. Comunicaciones y publicaciones derivadas de la tesis

ARTICULOS A REVISTAS INDEXADAS:

García-Menéndez E, Marques Vidas M, Alique M, Carracedo J, de Sequera P, Corchete E, et al. *Statins and antiplatelet agents are associated with changes in the circulatory markers of endothelial dysfunction in chronic kidney disease*. Nefrologia. 2019;39(3):287–93.

Alique M, Bodega G, Corchete E, **García-Menéndez E**, de Sequera P, Luque R, et al. *Microvesicles from indoxyl sulfate-treated endothelial cells induce vascular calcification in vitro*. Comput Struct Biotechnol J [Internet]. 2020;18:953–66.

de Sequera P, Corchete E, Bohorquez L, Albalate M, Perez-Garcia R, Alique M, Marques M, **García-Menéndez E**, et al. *Residual Renal Function in Hemodialysis and Inflammation*. Ther Apher Dial. 2017;21(6):592–8.

COMUNICACIONES A CONGRESOS EN REVISTAS INDEXADAS:

Alique M, Carracedo J, Bodega G, Corchete E, **García-Menéndez E**, De Sequera P, et al. *Vascular calcification in vitro produced by senescent microvesicles from indoxyl sulfate-treated endothelial cells*. Nephrol Dial Transplant. 2019;34(suppl 1).

Alique M, Bodega G, Giannarelli C, Bohorquez L, Corchete E, **García-Menéndez E**, et al. *Hypoxia-inducible factor-1 α regulates migration, proliferation and angiogenesis in replicative endothelial senescence independently of microrna-126 expression*. Nephrol Dial Transplant. 2017;32(suppl 3):iii456.

García-Menéndez E, Marques-Vidas M, Alique M, Carracedo J, de Sequera P, Corchete E, et al. *The use of statins is associated with a reduction of endothelial dysfunction markers in patients with chronic kidney disease*. Nephrol Dial Transplant [Internet]. 2017 May 1;32(suppl_3):iii441.

Corchete E, de Sequera P, Albalate M, Alique M, Bohorquez L, Ugalde B, Martin I, Cañizo FJ, **García E**, Marques M. Enfermedad renal crónica diabética, senescencia y enfermedad

cardiovascular. XLVIII Congreso de la Sociedad Española de Nefrología y IX Congreso Iberoamericano de Nefrología. 2018.

Alique M, Carracedo J, Bodega G, Corchete E, **García E**, de Sequera P, Marques M, Pérez R, Portolés J, Ramírez R. Indoxil sulfato induce senescencia y liberación de microvesículas en células endoteliales que promueven la calcificación vascular. XLVIII Congreso de la Sociedad Española de Nefrología y IX Congreso Iberoamericano de Nefrología. 2018.

COMUNICACIONES A CONGRESOS:

García E., Marques M, Alique M, Corchete E, De Sequera P, Fernández J, Pérez R, Ramírez R. El suero de pacientes con enfermedad renal crónica diabética altera la capacidad de reparación endotelial. XII reunión de la sociedad Madrileña de Nefrología. 2016 (Premio a la mejor Comunicación oral en Nefrología clínica)

Corchete E, De Sequera P, Albalade M, Alique, Ruiz C, **García E**, Puerta M, Pérez R, Portolés J, Ramírez R. Microinflamación en Hemodiálisis. XII reunión de la sociedad Madrileña de Nefrología. 2016.

García-Menéndez E, Luna-Ruiz C, López-Sánchez P, Marques Vidas M, Fernández-Cusicanqui J, Alique M, Navalmoral E, Ramírez-Chamond R, Portolés J. Efectos de las Estatinas y Antiagregantes Plaquetarios sobre la disfunción endotelial en pacientes con enfermedad renal crónica. XI reunión de la sociedad Madrileña de Nefrología. 2015.

García-Menéndez E, Luna-Ruiz C, Marques Vidas M, Fernández-Cusicanqui J, Navalmoral E, Palomino E, Rubio E, Huerta A, Valdenebro M, Ramírez R, Portolés J. La oxidación de proteínas en la ERC y la disfunción endotelial. Estudio traslacional. X reunión de la sociedad Madrileña de Nefrología. 2014.



Revista de la Sociedad Española de Nefrología

www.revistanefrologia.com

Original article

Statins and antiplatelet agents are associated with changes in the circulatory markers of endothelial dysfunction in chronic kidney disease

Estefanya García Menéndez^{a,*}, María Marques Vidas^{a,e}, Matilde Alique^b, Julia Carracedo^c, Patricia de Sequera^d, Elena Corchete^d, Rafael Pérez García^d, Rafael Ramírez Chamond^b, José M. Portolés^{a,e}

^a Servicio de Nefrología, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Majadahonda, Madrid, Spain

^b Facultad de Medicina y Ciencias de la Salud, Universidad de Alcalá, Departamento Biología de Sistemas, Alcalá de Henares, Madrid, Spain

^c Hospital Universitario Reina Sofía, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Córdoba, Spain

^d Servicio de Nefrología, Hospital Universitario Infanta Leonor, Madrid, Spain

^e REDInREN ISCIII 016/0091009 RETYC, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 February 2018

Accepted 9 November 2018

Available online 22 January 2019

Keywords:

Endothelial microvesicles

Chronic kidney disease

Endothelial dysfunction

Statins

Antiplatelet agents

ABSTRACT

Backgrounds and purposes: Patients with chronic kidney disease (CKD) have higher risk of developing cardiovascular disease. In CKD patients the mechanisms involved in, endothelial damage and the role of different drugs used on these patients are not completely understood. The aim of this work is to analyze the effect of statins and platelet antiaggregant (PA) on endothelial microvesicles (EMVs) and other markers of endothelial dysfunction.

Experimental approach: Cross-sectional study of 41 patients with CKD 3b-4 and 8 healthy volunteers. Circulating levels of EMVs, vascular endothelial growth factor (VEGF), and advanced oxidized protein products (AOPPS) were quantified and the correlation with different comorbidity variables and therapeutic strategies were evaluated.

Results: EMVs are increased in CKD patients as compared with controls (171.1 vs. 68.3/ l, $p < 0.001$). It was observed a negative correlation between age and EMVs. Statins and PA were associated with a reduction in EMVs and VEGF levels, independently of the serum total cholesterol levels (TC). The levels of AOPPS and VEGF were not different in CKD vs. controls.

DOI of original article:

<https://doi.org/10.1016/j.nefro.2018.11.001>.

Please cite this article as: García Menéndez E, Marques Vidas M, Alique M, Carracedo J, de Sequera P, Corchete E, et al. El uso de estatinas y antiagregantes se asocia con cambios en los marcadores de disfunción endotelial en la enfermedad renal crónica. Nefrología. 2019;39:287–293.

Corresponding author.

E-mail address: estefanyagarciam@gmail.com (E. García Menéndez).

2013-2514/© 2019 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Nefrología. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Conclusion: CKD is associated with a change in EMVs, VEGF and AOPP levels. The treatment with statins and PA normalizes these values to almost the observed in controls and this effect is independently of the prevailing TC level. These findings explain the existence of the pleiotropic effects of statins and PA which deserve further studies.

© 2019 Published by Elsevier España, S.L.U. on behalf of Sociedad Española de Nefrología.

This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

El uso de estatinas y antiagregantes se asocia con cambios en los marcadores de disfunción endotelial en la enfermedad renal crónica

R E S U M E N

Palabras clave:

Microvesículas endoteliales
Insuficiencia renal crónica
Disfunción endotelial
Estatinas
Antiagregantes plaquetarios

Antecedentes y objetivos: Los pacientes con insuficiencia renal crónica (IRC) corren mayor riesgo de desarrollar enfermedad cardiovascular. En los pacientes con IRC, los mecanismos implicados en la disfunción endotelial y el papel de los diferentes fármacos utilizados en estos pacientes no se conocen por completo. El objetivo de este artículo es analizar el efecto de las estatinas y los antiagregantes plaquetarios (AP) sobre las microvesículas endoteliales (MVE) y otros marcadores de la disfunción endotelial.

Enfoque experimental: Estudio transversal con 41 pacientes con IRC 3b-4 y 8 voluntarios sanos. Se cuantificaron los niveles de MVE, factor de crecimiento vascular endotelial (FCVE) y productos avanzados de oxidación de proteínas (AOPP, por sus siglas en inglés) en la circulación y se evaluó la correlación con diferentes variables de comorbilidad y estrategias terapéuticas.

Resultados: Las MVE aumentaron en pacientes con IRC al comparar los niveles con los controles (171,1 frente a 68,3/ l; $p < 0,001$). Se observó una correlación negativa entre la edad y las MVE. Las estatinas y los AP se asociaron con una reducción de los niveles de MVE y FCVE, independientemente de los niveles séricos de colesterol total (CT). Los niveles de AOPP y FCVE no fueron diferentes entre los pacientes con IRC y los controles.

Conclusión: La IRC se asocia con un cambio de los niveles de MVE, FCVE y AOPP. El tratamiento con estatinas y AP normaliza estos valores a casi los observados en los controles y este efecto es independiente del nivel de CT predominante. Estos hallazgos explican la existencia de los efectos pleiotrópicos de las estatinas y los AP que merecen estudios adicionales.

© 2019 Publicado por Elsevier España, S.L.U. en nombre de Sociedad Española de Nefrología. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

Introduction

Patients with chronic kidney disease (CKD) are more likely to develop cardiovascular disease (CVD), this is observed regardless of the rate of progression to advanced stages. It is a fact that the main cause of death in patients with CKD is cardiovascular.¹ The development of CVD in uremic patients involves complex processes of inflammation and endothelial dysfunction, whose final result is the atherosclerosis. In addition, the loss of arterial wall elasticity is a finding common in CKD and has been described as an independent predictor of cardiovascular events.²

The microvesicles (MVs) are corpuscles that can be released from almost any eukaryotic cell during both activation and cellular apoptosis.³ During the recent decades it has been shown that MVs derived from the endothelium (EMVs) are useful blood markers for different pathological situations such as vascular inflammation (acute or chronic) and endothelial dysfunction.⁴ In addition, many studies have shown that circulating EMVs can interact a subsequent fusion with cell membrane of different cells, such as endothelial cells and

leukocytes, this results in an effective delivery of components of its original cells to the target cells.³ The measurement of EMVs plasma levels may provide relevant information in both healthy and patients. Normally, the EMVs count increases after the induction of acute or chronic endothelial dysfunction.⁵ The mechanisms mediating the released these particles are not totally clear, and have been postulated as intermediate regulators of several growth factors and cytokines such as vascular endothelial growth factor (VEGF).⁶

Several studies have reported the association between CKD and circulating MVs, showing changes in serum MV levels, according to the stage of CKD or the modalities of renal replacement therapy.⁷ However, studies focused on circulating EMVs and CKD have led to nonuniform data.^{8,9} It has not been analyzed whether drugs commonly used in CKD that act on endothelial function (statins and antiplatelet agents) have some effect on the production of EMVs and other biomarkers.

The advanced oxidation protein products (AOPP) are a family of oxidized proteins that contain dityrosine, which are generated during stress oxidative and are measurable in plasma and that are useful as an early marker of oxidative

tissue damage. They have also been described as active mediators of the inflammation associated with the uremic state.¹⁰

The aim of this study was to analyze the effect of the use of statins and platelet antiaggregants (PA) on circulating EMVs and the expression of serum markers of endothelial dysfunction, oxidative stress and inflammation as AOPP and VEGF in a cohort of patients with CKD. Likewise, their relationship with other cardiovascular risk factors will be analyzed.

Methods

A cross-sectional study was conducted on 41 patients with CKD. The patients with a history of autoimmune diseases such as Lupus, Vasculitis or Glomerulonephritis with active urinary sediment were excluded. The control group included 8 healthy volunteers.

The study was approved by the Hospital Puerta de Hierro Ethics and Clinical research committee and before inclusion all participants provided written consent. Baseline demographics, clinical and laboratory data (total cholesterol level and fractions, uric acid, creatinine, etc.) and pharmacological treatment were recorded from structured electronic medical record-EMR (Nefrolink[®] and Selene[®]).

Blood collection, isolation and analysis by flow cytometry of EMVs

Blood samples were taken with a 21G gauge needle after applying a light tourniquet. The first 4 ml were discarded, the blood was collected in tubes with 3.2% trisodium citrate (Becton Dickinson, Plymouth, UK)]. Twenty minutes after collection, the plasma was centrifuged at 1500 *g*, without brake, for 20 min at room temperature. The plasma was centrifuged again for 2 more minutes at 13,000 *g* to obtain platelet-poor plasma, according to the method developed previously with minor modifications.¹¹ Aliquots of plasma were instantly frozen and stored at -80 °C until use.

The characterization of EMVs was obtained as previously described in other studies¹¹ using flow cytometry (Beckman Coulter Cytomic FC 500, CoulterInc, Fullerton, CA, USA) with CXP software (Beckman Coulter). According to the side scatter vs forward scatter dot-plot, MVs were considered those events gated in a size between 0.5 and 1.5 μm . This system was previously established in a standardization experiment using size-calibrated fluorescent beads with sizes ranging from 0.1 to 1.9 μm (SPHERO[™] Flow Cytometry Nano Fluorescent Size Standard Kit, Spherotech, Lake Forest, IL USA). A triple-fluorescent labeling was performed for EMVs characterization. One hundred ml of platelet-poor plasma was incubated with fluorescein isothiocyanate-conjugated labeled monoclonal anti-CD31 (BD Pharmingen, San Diego, California, USA), Peridinin Chlorophyll Protein Complex monoclonal anti-CD42b (Abcam, Cambridge, MA), and phycoerythrin-annexin V kits (BD Pharmingen, San Diego, California, USA) in annexin V-binding buffer (10 mM HEPES, 7.4 pH, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl₂) following the manufacturer's instructions of annexin V kit.

To identify the cell-specific monoclonal antibodies of MVs, these were incubated with identical concentrations of

isotype-matched control antibodies to set the threshold. As both platelets and endothelial cells express CD31, but CD42b occurs only on platelets, EMVs were CD31+/CD42- events. The absolute number of EMVs per microliter was quantified according to the manufacturer specification using Flow Count Calibrator beads (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, US).

AOPPs and VEGF

The plasma concentration of AOPP was measured in fasting plasma samples collected in tubes with ethylenediaminetetraacetic and kept frozen at -80 °C. AOPP concentration was measured by Western Blot using the Oxy Blot[™] Protein Oxidation Detection Kit, catalog no. S7150, Millipore.

The VEGF levels were analyzed in serum by ELISA using Quantikine VEGF ELISA kit (R&D Systems, Minneapolis, MN).

Statistical analysis

Results are expressed as percentage, median, range or interquartile range (IQR), unless indicated otherwise. Differences between groups were assessed by chi-square test, Fisher's exact test, Kruskal-Wallis test, Bonferroni correction or ANOVA according to the variables studied (post hoc analysis performed with Turkey's test). A linear regression analysis was performed to determine the level of EMVs according to treatment (statins or PA) adjusted for total cholesterol (TC) levels, indicating the β value and its 95% confidence interval (CI). The differences were considered significant if the *p* values <0.05. All tests were performed with software SSPS v 15.0 (Spss Inc., Chicago, IL, US) and Stata (StataCorp 2015. Stata Statistical Software: Release 14. College Station, TX: StataCorp LP).

Results

The study included 41 patients with a median age of 51.5 years IQR [42.5–72.5]. A 39% of the patients were diabetic, 85.4% hypertensive and 9.8% had a history of ischemic heart disease.

The most frequent cause of CKD was diabetic nephropathy in 39%, followed by a 19% of undiagnosed/other causes, 14.6% polycystic disease, 14.6% glomerular disease and 12.2% vascular disease.

The median estimated glomerular filtration rate (eGFR) using the CKD-EPI equation (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) was 31.9 ml/min (a 48.8% had eGFR <30 ml/min).

Respect to pharmacological treatment, most patients received angiotensin converting enzyme inhibitors (ACEIs) and/or Angiotensin Receptor Blocker (ARB) (78%), statins (48.8%) and PA (14.3%).

Levels of EMVs in the ERC

We detected an increase in circulating EMVs in patients with CKD as compared with the control group (171.1 EMVs/ μl vs 68.3 EMVs/ μl , *p* < 0.001), no significant correlation was observed between the eGFR and the amount of circulating EMVs.

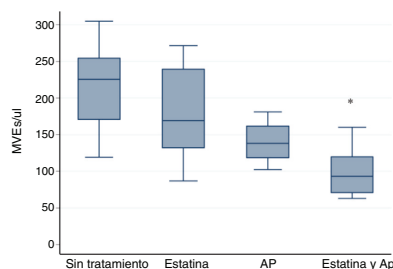


Fig. 1 – EMVs values according to the treatment with statin or PA. Values of $p < 0.05$ are indicated by an asterisk (*) and outlier values with this symbol (*). EMVs: endothelial microvesicles; PA: platelet antiaggregants. Box plots indicate median and interquartile range.

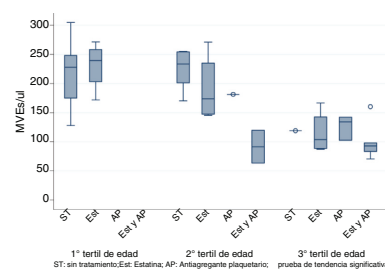


Fig. 2 – EMVs values stratifying the population by age tertiles. The statistical significance of the Ktau Trend test is indicated with two asterisks (**) and the outlier values with this symbol (*). EMVs: endothelial microvesicles. Box plots indicate median and interquartile range.

In our CKD patients, we did not find differences in the amount of EMVs according to the treatment received, for ACEIs/ARB, diuretics, beta-blockers, or erythropoietin.

However the association of statin and PA significantly decreases the amount of EMVs. The results were: in patients without treatment, 225.55 EMVs/ l (119.11–304.88); Statin 169.33 EMVs/ l (86.9–271.56); AP 138.33 EMVs/ l (102.44–181.11); Statin plus PA 93.11 EMVs/ l (63.11–160.22) $p < 0.001$ by Kruskal–Wallis test.

The post hoc analysis with the Bonferroni correction indicates statistically significant differences only between statin plus PA vs no treatment $p < 0.001$ (Fig. 1).

Table 1 describes the baseline characteristics according to the treatment. Patients on statins or PA were older, with higher proportion of diabetes mellitus (DM) and lower total serum cholesterol (TC) levels.

A subanalysis in the diabetic population could not be performed because most of them were receiving statin or PA.

We found a positive association between EMVs count and TC levels. In patients with a TC < 200 mg/dl treated with statins the EMVs levels were reduced (191.0 EMVs/ l vs 119.8 EMVs/ l, $p = 0.032$). By linear regression, it was identified that patients on treatment with statins or PA had reduced circulating levels of EMVs, independently of the TC levels ($\beta = 46.02$, IC [88.59 to 3.46]). Age correlated negatively with EMV levels (Spearman test $p < 0.05$).

To eliminate the bias produced by age, patients were stratified by tertiles of age and it was observed the use of statins and PA together significantly decreased EMVs levels only in the 2nd tertile (50–70 years) as shown in Fig. 2 (K-tau trend test < 0.05).

VEGF and AOPPs in patients with CKD.

No differences were observed in the serum levels of VEGF of CKD vs control groups. The treatment with statins and PA had an effect on the serum levels of VEGF that was similar

Table 1 Baseline characteristics according to received treatment.

	No treatment	Statin	PA	Statin and PA	Total	p
Men (%)	61.1	83.3	100	72.4	73.2	0.3
Age (median [IQR])	43.0 [37.5–52.5]	54.5 [45.5–71.5]	76.5 [62.5–81.5]	76.5 [66.5–81.5]	51.5 [42.4–72.5]	0.002
Age > 50 years (%)	33.3	58.3	75.0	85.7	53.7	0.08
Hypertension (%)	72.2	91.7	100.0	57.1	78.0	0.2
DM (%)	11.1	33.3	100.0	85.7	39.0	<0.001
Hyperuricemia (%)	50.0	58.3	25.0	48.9	48.8	0.7
Dyslipemia (%)	22.2	66.7	50.0	85.7	48.8	0.02
eGFR CKD-EPI (%)						
<30	38.9	41.7	100.0	57.1	48.8	
31–44	16.7	41.7	0.0	42.9	26.8	0.2
45–59	27.8	8.3	0.0	0.0	14.6	
>60	16.7	8.3	0.0	0.0	9.8	
TC mg/dl (median [IQR])	191.0 [161.0–226.0]	161.5 [140.0–189.5]	162.0 [150.0–184.5]	127.0 [116.0–168.0]	173.0 [149.0–196.0]	0.005
TC > 200 mg/dl (%)	38.9	8.5	0.0	0.0	19.5	0.048

PA: platelet antiaggregants; TC: total cholesterol; DM: diabetes mellitus; eGFR: estimated glomerular filtration rate by CKD-EPI ml/min/1.73 m²; IQR: interquartile range. Are considered significant values: $p < 0.05$.

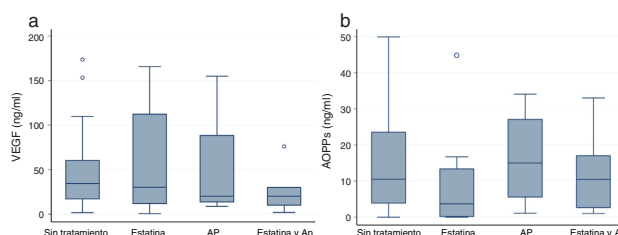


Fig. 3 – AOPP (a) and VEGF (b) values according to the treatment with statin or PA. Values of $p < 0.05$ are indicated by an asterisk (*) and outlayer values with this symbol (°). AOPP: advanced protein oxidation products; VEGF: vascular endothelial growth factor; PA: platelet antiaggregants. Box plots indicate median and interquartile range.

to the observed in circulating EMVs (Fig. 3a) although without achieving statistical significance.

Serum AOPPs was increased in patients with CKD as compared with controls although without statistical significance (7.51 ng/ml vs 9.91 ng/ml). The pharmacological treatment showed no effect on the serum levels of AOPPs (Fig. 3b).

Discussion

Our work describes for the first time in CKD patients, an association between circulating levels of EMVs, VEGF, AOPPs and commonly used drugs in our population, specifically, the use of statins and PA. In addition, we have shown an increase in circulating levels of EMVs in patients with CKD corroborating the finding previously described by other authors.¹²

It is known that patients with CKD are more likely to suffer CVD, as illustrated in previous epidemiological studies¹. There are several changes in the structure and functional characteristics of the artery wall that have been related to CKD, such as arterial stiffness, endothelial dysfunction and a reduction in the production of nitric oxide (NO).^{13,14} Although traditional risk factors such as age, hypertension and dyslipidemia are classically associated with these alterations, they do not able to fully explain the changes observed in patients with CKD. Therefore, we need additional information to sustain an integrated and more complete pathological model.

Other authors have described high levels of EMVs in patients with CKD, like in other high-risk CV patients with acute coronary syndrome or hypertension.⁴ We do not know the mechanisms that lead to the increase in EMVs observed in patients with CKD; several hypotheses have been proposed, including oxidative stress, cytokines and endogenous lipopolysaccharides.¹⁵

The experiments of Amabile et al.⁸ showed that EMVs of patients with CKD of any cause generated endothelial dysfunction decreasing generation in vitro of NO and affecting relaxation in the healthy arterial wall dependent on NO and cyclic guanosine monophosphate. For this reason, EMV could be more an effector agent than a biomarker of endothelial damage in CVD associated with CKD, in which case it becomes therapeutic target.

The role of statins in the formation of EMVs has been previously tested with non uniform results. Probably, this is due to the complexity of the pathophysiological mechanisms that involve CVD and the effects of confounding factors such as age, gender and associated comorbidity. Previous studies have described that atorvastatin decreases levels of circulating EMVs in patients with ischemic cardiomyopathy, independently of TC levels and their fractions¹⁶; this results have been confirmed in our study.

The clinical trial of cardiac and renal protection (SHARP) demonstrated that statin therapy modifies atherosclerotic events in CKD patients, regardless of the serum levels of TC¹⁷ suggesting pleiotropic effect of these drugs.

Our previous in vitro studies have shown that the addition of atorvastatin decreases the production of reactive oxygen species (ROS) induced by indoxyl sulfate in Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) (unpublished data) that support the previous hypothesis of the existence of pleiotropic effects of statins on endothelial cells.^{18,19}

The results presented here, raise the possible existence of other mechanisms pleiotropics of the statin on the vascular wall, in this case mediated by EMVs.

Antiplatelet drugs have also been shown to modify the amount of EMVs circulating in various clinical and experimental scenarios.²⁰ In this sense, Bulut et al.²¹ demonstrated that treatment with acetylsalicylic acid reduces the number of circulating EMVs in patients with acute coronary disease by an unknown mechanism. It is known that aspirin improves vascular endothelial function by mechanisms independent of Cyclooxygenase²² and it is debatable whether this could have additional cardioprotective effects beyond those attributed to the antithrombotic activity.

Since EMVs can directly induce endothelial dysfunction, the effect of aspirin in reducing circulating EMVs could explain the mechanism of endothelial protection of this drug.

Inflammatory mediators such as tumor necrosis factor , interleukin-1 and thrombin drive the generation of EMVs and it is believed that these MVs act in a paracrine fashion, inducing further vascular inflammation.²³ It is known that VEGF, one of the main mediators of angiogenesis, has potent effects for mobilization in progenitor endothelial cells. However, its effect on the circulating levels of EMVs is controversial. EMVs